

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



542937

(43) Fecha de publicación internacional
12 de Agosto de 2004 (12.08.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/067740 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12N 15/09,
C12Q 1/68

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2004/070001

(22) Fecha de presentación internacional:
21 de Enero de 2004 (21.01.2004)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200300206 28 de Enero de 2003 (28.01.2003) ES
P200302671
17 de Noviembre de 2003 (17.11.2003) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): EFARMES, S.A. [ES/ES]; Sardenya, 350, 08025
Barcelona (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): MATA
LOPEZ, Pedro [ES/ES]; Sardenya, 350, 08025
Barcelona (ES). ALONSO KARLEZI, Rodrigo, Al-
berto [ES/ES]; Sardenya, 350, 08025 Barcelona (ES).
MOZAS ALONSO, Pilar [ES/ES]; Sardenya, 350, 08025
Barcelona (ES). REYES LEAL, Gilberto [ES/ES]; Sar-
denya, 350, 08025 Barcelona (ES). POCIVI MIERAS,
Miguel [ES/ES]; Sardenya, 350, 08025 Barcelona (ES).
CASTILLO FERNANDEZ, Sergio [ES/ES]; Sardenya,
350, 08025 Barcelona (ES). TEJEDOR HERNANDEZ,

Diego [ES/ES]; Sardenya, 350, 08025 Barcelona (ES).
MARTINEZ MARTINEZ, Antonio [ES/ES]; Sardenya,
350, 08025 Barcelona (ES). MALLÉN PEREZ, Miguel
[ES/ES]; Sardenya, 350, 08025 Barcelona (ES).

(74) Mandatario: ELZABURU, Alberto, de; Miguel Angel,
21, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivin-
dicaciones y para ser republicada si se reciben modifica-
ciones

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR THE DETECTION OF MUTATIONS IN ISOLATED GENE SEQUENCES OF
THE LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR (LDL-R) WHICH IS ASSOCIATED WITH FAMILIAL HYPERCHOLE-
STEROLEMIA

(54) Título: PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN SECUENCIAS GÉNICAS AISLA-
DAS DEL RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL-R) ASOCIADO CON LA HIPERCOLESTEROLE-
MIA FAMILIAR

(57) Abstract: The invention relates to extracorporeal methods of analysing the presence or absence of mutations which cause
familial hypercholesterolemia. The inventive methods describe the way in which said mutations can be detected using a DNA sample
from an individual and comprising the following: chain reaction of the polymerase with primers which are complementary to the low-
density lipoprotein receptor gene; analysis of the amplified product by sequencing; restriction analysis; single strand conformation
polymorphism techniques; heteroduplex analysis and analysis of a device on top of a biochip glass support on which oligonucleotide
probes are disposed, which can be used to detect the aforementioned mutations in the DNA.

(57) Resumen: La invención describe métodos extracorpóreos para analizar la presencia o ausencia de mutaciones causantes de
hipercolesterolemia familiar. Los métodos indican la forma de detectar estas mutaciones a partir de una muestra de ADN de un
individuo y utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores complementarios al gen del receptor de las lipoproteínas
de baja densidad, el análisis del producto amplificado por secuenciación, análisis de restricción, técnicas de los polimorfismos de
conformación de cadena sencilla, análisis de heterodúplex y de un dispositivo sobre un soporte de vidrio "biochip" en el que se
depositan sondas de oligonucleótidos que permite detectar estas mutaciones en el ADN.

WO 2004/067740 A1



*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

- 1 -

**PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN
SECUENCIAS GÉNICAS AISLADAS DEL RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNAS
DE BAJA DENSIDAD (LDL-R) ASOCIADO CON LA
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR.**

5

Ambito de la invención

La invención se adscribe al sector técnico-industrial del diagnóstico in vitro, extracorpóreo, de muestras biológicas, mediante técnicas de ingeniería genética, para determinar la predisposición de un individuo al desarrollo de la enfermedad denominada
10 hipercolesterolemia familiar.

Antecedentes de la invención

La aterosclerosis se define según la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una combinación de cambios que se produce en la íntima de las arterias a consecuencia de un acúmulo focal de lípidos y componentes complejos que se acompaña
15 con la formación de tejido fibroso y calcificación que a su vez se asocia con cambios en estructura de la media.

La aterosclerosis puede considerarse como una forma especial de arteriosclerosis con un depósito patogénico de lípidos en la pared arterial. La mayoría de formas de la arteriosclerosis implican la degeneración grasa de la pared vascular, con lo que el término
20 arteriosclerosis y aterosclerosis suele utilizarse de forma indistinta (Assmann G. in "Lipid Metabolism and Atherosclerosis" Schattauer Verlag GmbH, Stuttgart 1982:1).

Los lípidos son sustancias insolubles en disoluciones acuosas. Las lipoproteínas son las partículas que posibilitan el transporte de los lípidos en la sangre. Las lipoproteínas se dividen en varias categorías según su densidad dependiendo de como
25 pueden separarse por ultracentrifugación. (Havel RJ y col. J Clin Invest 1955, 34:1345). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) ($d=1.019-1.063$ g/mL) son las que mayoritariamente transportan el colesterol en el torrente circulatorio. Estas lipoproteínas están formadas por el 75% de lípidos (principalmente colesterol libre, colesterol
30 esterificado y fosfolípidos), alrededor el 70 % del colesterol total de la sangre es transportado por las partículas LDL.

- 2 -

El término hipercolesterolemia se utiliza para reflejar la elevación del colesterol del plasma por encima de los niveles considerados normales para una determinada población y es uno de los factores cruciales para el inicio y progresión de la arteriosclerosis. Más de la mitad de todas las muertes que se producen en los países desarrollados están relacionados con la enfermedad cardiovascular arteriosclerosa (Murray CJL y Lopez AD. Lancet 1997; 349:1269-1276).

Las hipercolesterolemia familiar (HF) es una enfermedad de herencia autosómica dominante causada por mutaciones que se producen en el gen del receptor de las LDL (r-LDL), este gen codifica una proteína que permite la captación y degradación intracelular de las LDL (Goldstein JL, y Brown MS Ann Rev Cell Biol 1985; 1:1-39).

La penetrancia de la HF es cercana al 100% lo que significa que la mitad de la descendencia de una persona afectada tendrá su colesterol plasmático muy elevado desde el momento de nacer, afectando por igual a hombres y mujeres (Goldstein JL, Brown MS. The metabolic basis of inherited disease. Editores: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. McGraw Hill New York 6th edition, 1989; 1215-1250).

Los pacientes con HF presentan como síntomas característicos clínicos arco corneal, xantomas tendinosos y enfermedad coronaria prematura (Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. Atherosclerosis 1999; 142: 105-115). La HF es una de las enfermedades monogénicas mas frecuentes con una prevalencia estimada de pacientes heterocigotos de una en cada 500 personas y de heterocigotos de una en cada 1.000.000.

Determinadas poblaciones tales como los canadienses de habla francesa (Leitersdorf E y col. J Clin Invest 1990; 85:1014-1023), cristianos libaneses (Lehrman MA y col. J Biol Chem 1987; 262:401-410), drusos (Landsberger D y col. Am J Hum Genet 1992; 50: 427-433) finlandeses (Koivisto UM y col. J Clin Invest 1992; 90: 219-228), los "afrikaners" de Surafrica (Kotze MJ y col. Ann Hum Genet 1991; 55: 115-121), los judíos Ashkenazi de descendencia lituana (Meiner V y col. Am J Hum Genet 1991; 49:443-449) presentan la particularidad que solo tienen unas pocas mutaciones responsables de la HF, esto es consecuencia de un efecto fundador y por lo tanto la frecuencia de heterocigotos en estas poblaciones es mas alta que lo estimado para otras poblaciones.

- 3 -

Los pacientes con HF presentan una concentración de colesterol en plasma muy elevada, por regla general superior al percentil 95. La mortalidad de los pacientes con HF, ajustada por edad y sexo, es entre cuatro y cinco veces mas alta que en la población general (Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. Atherosclerosis 1999; 142: 105-115). Los pacientes que heredan dos mutaciones en el locus del gen del r-LDL se denominan HF homocigotos o HF heterocigotos compuestos en cuyo caso prácticamente no hay receptores funcionales lo que condiciona que la concentración de c-LDL se eleve entre seis y ocho veces en relación a la considerada normal. La mayoría de pacientes de esta categoría presentan enfermedad coronaria antes de los 20 años (Goldstein JL y col. N Engl J Med 1983; 309:288-296). Si los pacientes homocigotos o los heterocigotos fueran diagnosticados antes de que presentaran signos de enfermedad coronaria y tratados de forma preventiva su riesgo de infarto de miocardio se vería reducido de forma sustancial

El r-LDL es una glicoproteína ubicua de membrana de 839 aminoácidos que capta e internaliza partículas LDL por un mecanismo denominado de endocitosis (Goldstein J. y Brown M. J Biol Chem 1974; 249:5153-5162) (Figura 1).

El gen del r-LDL se encuentra situado en el brazo corto del cromosoma 19 región p13.1-13.3 (Yamamoto T y col. Cell 1984; 39: 27-38), tiene un tamaño de 45.000 pares de bases (pb). Este gen consta de 18 exones y 17 intrones los cuales codifican los seis dominios funcionales de la proteína: El péptido señal, el dominio de unión del ligando, el dominio homólogo al factor de crecimiento epidérmico (EGF), la zona de glicosilación, el dominio transmembrana y el citoplásmico (Sundhof T y col. Science 1985; 228:893-895) (Figura 2).

La síntesis de r-LDL se encuentra regulada por un sofisticado mecanismo de retroalimentación que controla la transcripción del gen del r-LDL en función de las variaciones de la concentración intracelular de esteroides y la demanda celular de colesterol (Sudhof TC y col. J Biol Chem 1987; 262:10773-10779). Las secuencias del ADN necesarias para la regulación de la transcripción del gen del r-LDL están situadas en una región de 177 pb de la zona promotora (Sudhof TC y col. J Biol Chem 1987; 262: 10773-10779). Esta región contiene todos los elementos en cis que permiten la expresión basal así como la regulación por esteroides y contiene tres repeticiones de 16 pb cada una. La repetición 1 y 3 contienen un sitio de unión para el factor de transcripción Sp1 y son

- 4 -

esenciales para que se produzca la expresión basal del gen pero requieren de la contribución de la repetición 2 para la expresión completa (Dawson PA y col. J Biol Chem 1988; 263:3372-3379). La repetición 2 incluye un elemento de regulación por esteroides de 10 pb, SRE-1 (Smith JR y col. J Biol Chem 1990; 265:2306-2310) que
5 posibilita la unión del factor de transcripción denominado SREBP-1 el cual aumenta la transcripción cuando la concentración de esteroides intracelulares disminuye. Hasta la fecha, se han descrito varias mutaciones situadas en los elementos reguladores de la transcripción del receptor LDL (Hobbs HH, y col al. Hum Mutat 1992; 1:445-466; Koivisto UM. Y col Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91:10526-10530), Mozas P, y col J
10 Lipid Res 2002; 43:13-18, <http://www.ucl.ac.uk/fh>; <http://www.umd.necker.fr>).

El exón 1 codifica el péptido señal el cual consiste en una secuencia de 21 amino ácidos que es eliminado de la proteína durante la translocación que tiene lugar en el retículo endoplásmico. Se han descrito varias mutaciones en este exón que incluyen cambios de pauta de lectura, cambios de aminoácido o codones de parada
15 (<http://www.ucl.ac.uk/fh>; <http://www.umd.necker.fr>).

Los exones del 2 al 6 codifican el dominio de unión al ligando, el cual consta de siete repeticiones en tandem de 40 amino ácidos. La estructura de este dominio ha sido resuelta de forma parcial (Jeon H y col. Nature Struc Biol 2001; 8:499-5049). En cada repetición tiene una agrupación de aminoácidos cargados negativamente Asp-X-Ser-Asp-
20 Glu y seis restos de cisteína que forman tres enlaces disulfuro.

El segundo dominio del r-LDL consta de una secuencia de 400 amino ácidos codificada por los exones 7 al 14. Esta secuencia tiene un 33% de homología con el factor precursor del crecimiento de la epidermis (EGFP). Al igual que el dominio de unión al ligando, esta región, contiene tres repeticiones de 40 amino ácidos con
25 secuencias ricas en cisteína. Las dos primeras repeticiones, denominadas A y B, son contiguas y están separadas de la tercera repetición por una región de 280 amino ácidos que contiene cinco copias de la secuencia YWTD (Tyr-Trp-Thr-Asp). El dominio análogo al EGFP es fundamental para la disociación ácida del r-LDL de las partículas recubiertas de clatrina que tiene lugar en el endosoma durante el proceso de reciclado del
30 receptor. De todas las mutaciones descritas hasta la fecha, aproximadamente el 55% están localizadas en la región homóloga EGFP y el 35% están localizadas en las repeticiones YWTD (<http://www.ucl.ac.uk/fh>).

- 5 -

El tercer dominio del r-LDL, codificado por el exón 15, es una región en la que abundan los amino ácidos treonina y serina. La función de este dominio se desconoce, pero se sabe que en esta región están ancladas las cadenas de carbohidratos. Esta zona está muy poco conservada en seis especies analizadas y se cree que desempeña una función estabilizadora del receptor. (Goldstein y col. En *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Editores Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. 7th Edition. McGraw Hill, 1995: 1981-2030).

El dominio transmembrana consta de 22 amino ácidos hidrofóbicos codificados por el exón 16 y el extremo 5' del exón 17. Este dominio es esencial para el anclaje del receptor a la membrana celular.

El dominio citoplásmico del r-LDL, está formado por una secuencia de 50 amino ácidos codificada por la región 3' del exón 17 y la 5' del exón 18. Este dominio contiene dos secuencias señal que permiten dirigir a la proteína a la superficie celular y situar al receptor en las partículas revestidas (Yokode M, y col. *J Cell Biol* 1992; 117: 39-46). Este dominio es uno de los más conservados, con un porcentaje de aminoácidos conservados del 86% entre seis especies analizadas.

Las mutaciones del r-LDL que se han encontrado en pacientes con HF se clasifican en 5 clases: alelos nulos, defectuosos en el transporte, defectuosos en la unión, en la internalización y reciclado. Por regla general cada categoría está asociada con mutaciones localizadas en una región del gen que codifican un dominio particular de la proteína. (Hobbs HH, et al. *Hum Mutat* 1992; 1:445-466).

La heterogeneidad que presentan los pacientes con HF en cuanto a los niveles plasmáticos de colesterol ligado a LDL (C-LDL) y enfermedad coronaria se debe en parte a diferencias en cuanto al tipo de mutación (Sun XM y col. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1993; 13:1680-1688, Kotze y col. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1993; 13: 1460-1468; Gudnason V y col. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1997; 17:3092-3101). Por otra parte, el descenso que se produce en la concentración del c-LDL en pacientes HF heterocigotos tras el tratamiento con inhibidores de la hidroximetilglutaril coenzima A (HMGCoA) reductasa depende, en parte, de la naturaleza de la mutación del gen r-LDL (Leisterdorf E y col. *Circulation* 1993; 87:35-44; Jeenah M y col. *Atherosclerosis* 1993; 98:51-58, Sijbrands EJG y col. *Atherosclerosis* 1998; 136: 247-254).

- 6 -

El principal ligando del receptor es la partícula LDL la cual contiene una sola copia de una proteína denominada la apolipoproteína B-100 (ApoB-100) (Goldstein J y Brown M J Biol Chem 1974; 249:5153-5162). Esta apolipoproteína tiene una zona en la que abundan los aminoácidos básicos y es el lugar donde se une al receptor (Borén J y col. J Clin Invest 1998; 101: 1084-1093). Se han encontrado varias mutaciones en el gen de la apoB-100 que alteran la funcionalidad de la proteína y disminuyen la capacidad de retirada de las partículas LDL, dando como resultado el acúmulo de c-LDL en plasma. Hasta la fecha se han descrito cuatro mutaciones en el gen de apo B-100 que cursan con una hipercolesterolemia que se denomina apolipoproteína B defectuosa familiar (BDF), todas estas mutaciones se encuentran localizadas en el dominio de unión de la apo-B100; amino ácidos 3130-3630: R3480W, R3500Q, R3500W y R3531C (Soria L y col. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 587-591; Pullinger CR, y col. J Clin Invest 1995; 95:1225-1234; Gaffney D, y col. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 15:1025-1029; Boren J, y col. J Biol Chem 2001; 276: 9214-9218). Una mutación que cambia el codón de la posición 3500 CGG por CAG dando lugar a una sustitución de una Glutamina por Arginina (R3500Q), es la mas frecuente de toda las que cursan con BDF. Los pacientes heterocigotos para la mutación apo B-3500 son por regla general hipercolesterolemicos, aunque su concentración de colesterol total plasmático varía dentro del rango observado en pacientes con HF hasta concentraciones moderadamente elevadas. (Tybjaerg-Hansen A, y col. Atherosclerosis 1990; 80:235-242; Hansen PS, y col. Arterioscl Throm Vasc Biol 1997; 17:741-747). Dado que las características y bioquímicas de estos pacientes son muy similares, el diagnóstico diferencial entre los pacientes con BDF o HF sólo es posible a través del diagnóstico genético molecular.

El diagnóstico clínico de la HF se fundamenta en los datos analíticos de lípidos y lipoproteínas del plasma, sintomatología clínica (xantomas) e historia familiar y personal de enfermedad coronaria. La OMS a través de su programa MedPed recomienda una serie de criterios a seguir para llevar a cabo el diagnóstico clínico de HF. Estos criterios están basados en una puntuación que depende de la historia personal y familiar de hipercolesterolemia, de las características clínicas y de la analítica del paciente. Cuando la puntuación que alcanza el paciente es igual o superior a 8 puntos el criterio clínico de diagnóstico de HF se clasifica como "seguro", entre 5 y 8 puntos de "probable" y entre 3 y 5 puntos de "posible" (Familial Hypercholesterolemia. Report of a second WHO

- 7 -

consultation. The International MedPed FH Organization, Geneva 1998). Sin embargo, algunos pacientes no cumplen con los criterios de HF porque la historia familiar es incompleta o desconocida, o bien porque en el momento del análisis solo presentan concentraciones moderadas de colesterol plasmático y carecen de signos de depósito de
5 colesterol en tejidos, tales como xantomas tendinosos, arco corneal o xantelasmas.

En familias cuyo mutación del gen del r-LDL se conoce se ha demostrado que el mejor “punto de corte” para el diagnóstico es el utilizar el percentil 90 para la concentración de c-LDL (Umans-Eckenhause MAW y col. Lancet 2001; 357:165-168. Sin embargo, el 18% de los pacientes portadores de la mutación presentan una
10 concentración de colesterol total por debajo de este percentil, por otra parte, la proporción de falsos positivos fue también del 18%. Por lo tanto, se comete porcentaje alto de diagnósticos equivocados si se utiliza solo la cifra de colesterol plasmático. Se ha publicado, que más del 50% de los pacientes con HF no reciben tratamiento farmacológico hipolipemiante ni consejo dietético como consecuencia de no haber sido
15 diagnosticados correctamente como pacientes con HF (Williams RR y col. Am J Cardiol 1993; 72:18D-24D).

El conocimiento de las bases moleculares de la HF ha permitido que se pueda realizar el diagnóstico inequívoco a nivel del ADN en la gran mayoría de casos: la demostración de un defecto molecular en el gen del r-LDL constituye una confirmación
20 definitiva del diagnóstico (Familial Hypercholesterolemia. Report of a second WHO consultation. The International MedPed FH Organization, Geneva 1998). El diagnóstico preciso de la HF es posible utilizando métodos de biología molecular, sin embargo, en la actualidad su utilidad en poblaciones heretogéneas se encuentra limitada debido a la gran heterogeneidad de las mutaciones del gen del r-LDL.

En la solicitud PCT WO-88/03175 (Biotechnology Research Partners, Ltd.) se reivindica un método para el diagnóstico de la aterosclerosis, que se basa en la detección de la presencia o ausencia de varios polimorfismos en la región génica de la apolipoproteína AI-CIII-AIV, o en los genes apoB, apoCI, apoAII, así como en el gen del receptor de LDL. Concretamente para este gen, se presenta el empleo de los
25 polimorfismos Cfr131 y BstEII.
30

Otro documento de interés es la patente japonesa JP-10099099 que, se refiere al empleo de una mutación en el triplete codificante del aminoácido 109, en concreto la

- 8 -

inserción de una C, para el diagnóstico de anormalidades en el gen del receptor de LDL, aunque no se menciona concretamente la hipercolesterolemia familiar.

Finalmente, las patentes norteamericana US-4.745.060 y US-4.966.837, ambas de la Universidad de Texas, presentan métodos para el diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar basándose en mutaciones en el gen del receptor de LDL. Sin embargo, lo que se reivindica en la primera de ellas son secuencias correspondientes al gen "normal", presentando un ejemplo puntual de una mutación que se define por el cambio del mapa de restricción con Xba I. En la segunda patente, por su parte, se reivindica el empleo de varias enzimas de restricción (Eco RI, Asp 718, Taq I, Bam HI, Xba I, Inf. I, Bgl II, Cla I, Eco RV, Kpn I, Pvu II, Sph I, Sst I, Sst II, Stu I, Xho I, Nde I y Nsi I) en un método para determinar mutaciones en el gen r-LDL, que se basa en observar la alteración del modelo de restricción con estas enzimas frente al modelo correspondiente al gen normal.

El documento de patente más próximo a la invención es WO02/06467, en el que se describe un método de detección de errores en el metabolismo lipídico basado en una serie de mutaciones y polimorfismos del gen r-LDL. Sin embargo, ninguna de las mutaciones ni polimorfismos descritos en dicha patente coincide con los reivindicados en la presente solicitud.

Descripción detallada de la invención

- La nomenclatura de las mutaciones y los polimorfismos viene definida en
- Antorakis S. E and the Nomenclature Working Group, Recommendations for Nomenclature Systems for Human Gene Mutations. Human Mutation 11:1-3; 1998.
 - Dunnen JT, Antorakis S.E. Mutation Nomenclature Extensions and Suggestions to describe Complex Mutations: A Discussion. Human Mutation 15: 7-12, 2000.

Asimismo el concepto del polimorfismos se define en

- Harris H. The Principles of Human Biochemical Genetics 3rd Edition. Amsterdam. North-Holland 1980.
- Beauder AL, Scriver CL, Sly WS, Valle D. Genetics, Biochemistry and Molecular Basis of Variant Human Phenotypes, En The Metabolic and Molecular Bases of

- 9 -

Inherited Disease. Editores Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D 7th Edition. pg. 53 MacGraw Hill. New York 1995.

Se han detectado, aislado y caracterizado toda una serie de mutaciones nuevas que se detallan a continuación. Asimismo, toda una serie de mutaciones y polimorfismos ya descritos, se han combinado con aquéllas para analizar la probabilidad de que un individuo desarrolle hipercolesterolemia familiar. Todas las mutaciones y polimorfismos que en esta invención se relacionan con el desarrollo de la hipercolesterolemia familiar, se producen en la secuencia génica SEQ ID NO: 1 correspondiente al gen del receptor de lipoproteínas de baja densidad (r-LDL). Es decir, todas las mutaciones se producen en el mismo gen, se emplean en el mismo dispositivo de ensayo, utilizándose la misma tecnología, para determinar, según un mismo método, extracorpóreamente e in vitro, la probabilidad de desarrollar la misma enfermedad, lo que apoya el carácter unitario de la invención.

En la Tabla I se detallan todas las mutaciones nuevas detectadas, según la nomenclatura científicamente aprobada y detallada en las publicaciones mencionadas anteriormente. Asimismo se les otorga un código alfa-numérico.

En la Tabla II se detallan mutaciones ya descritas y conocidas, cuyo uso en combinación con las mutaciones de la Tabla I, en dispositivos de ensayo in vitro para diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar es una de las formas preferidas, nueva e inventiva, de realización de la invención. Asimismo, de forma análoga a lo mencionado para las mutaciones conocidas, en la Tabla III se detallan polimorfismos.

Las mutaciones de amino ácidos se representan en códigos de una letra que tienen su equivalencia según la Tabla IV.

- 10 -

TABLA I

	MUTACION	CÓDIGO
5	(-23)A>C	M002
	1054 del11	M006
	108delC	M008
	1197del9	M009
10	1207delT	M010
	1432delG	M012
	191-2delAinsCT	M016
	2184delG	M020
	231delC	M022
15	2399del5/ins4	M024
	313+1insT	M027
	338del16	M029
	509insC	M030
	675del15	M032
20	684dup12	M034
	941-39C>T	M041
	C195R	M046
	C255G	M0100
	C319Y	M050
25	D157G	M059
	D630N	M063
	E291X	M068
	H635N	M096
	N59K	M074
30	T41M	M097
	W515X	M098
	Y379X	M092
	Y421X	M093
	T433N	M105
35	818del8	M110
	1423delGC/insA	M111
	1204insT	M112
	451del3	M115
	G516X	M117
40	2389+4A>G	M120
	1815del11	M121
	1186+5G>A	M129
	T740M	M131
	I771T	M135
45	R279G	M138
	T446I	M141
	H562Q	M142

- 11 -

	C74Y	M145
	D686Y	M147
	G(-2)R	M149
	E579D	M150
5	S205C	M151
	D200V	M153
	V766E	M154
	L(-6)P	M155
	2544insC	M156
10	C42Y	M157
	2389+3A>C	M160
	[1587-5del5;1587del31]M161	

TABLA II

15	MUTACIÓN	CÓDIGO	MUTACIÓN	CODIGO
	2393del9	M001	C646Y	M053
	(-42)C>G	M003	C677Y	M054
	(-49)C>T	M004	C68W	M055
20	1045delC	M005	C74G	M056
	1061-8T>C	M007	C95R	M057
	A378T	M0102	D151N	M058
	C358R	M0104	D200G	M060
	1358+1G>A	M011	D200Y	M061
25	1706-10G>A	M014	D280G	M062
	1845+1G>C	M015	E10X	M064
	2085del19	M017	E246A	M066
	211delG	M018	E256K	M067
	2140+5G>A	M019	F634L	M069
30	2207insT	M021	G322S	M070
	2390-1G>C	M023	G352D	M071
	313+1G>C	M025	G571E	M072
	313+1G>A	M026	N543H	M073
	518delG	M031	N804K	M075
35	7delC	M035	Q12X	M076
	872delC	M036	Q133X	M077
	884delT	M038	Q357P	M078
	920ins4	M039	Q427X	M079
	A519T	M042	Q71E	M080
40	C113W	M043	R395Q	M081
	C127R	M045	R574W	M082
	C255X	M047	R612C	M083
	C281Y	M048	S156L	M084
	C297F	M049	S205P	M085
45	C347Y	M051	T413K	M086
	C371X	M052	T705I	M087

- 12 -

TABLA II (continuación)

	MUTACIÓN	CODIGO
5	V502M	M089
	W(-18)X	M090
	W541X	M091
	D679E	M094
	1359-1G>A	M099
10	681ins21	M033
	C122X	M044
	V408M	M088
	G528D	M106
	D412H	M107
15	N619N	M108
	E80K	M109
	L534P	M113
	L621S	M114
	C356Y	M116
20	R329X	M119
	G248D	M122
	C201Y	M125
	313+5G>A	M126
	C358Y	M127
25	C331R	M128
	D157N	M130
	V776M	M134
	P664L	M136
	W462X	M137
30	Q328X	M139
	L584P	M140
	R395W	M143
	G314V	M144
	W469X	M146
35	P678L	M148
	R612H	M152
	R236W	M159

- 13 -

TABLA III

	POLIMORFISMOS	CÓDIGO
5	81T>C BstUI Exón 2	P1
	1060+10G>C SmaI Exón 7	P2
	1171G>A StuI Exón 8	P3
	1413G>A DdeI Exón 10	P4
10	1617C>T BstNI Exón 11	P5
	1725C>T SSCP Exón 12	P6
	1771C>T HincII Exón 12	P7
	1959 T>C AvaII Exón 13	P8
15	2232G>A MspI Exón 15	P9

TABLA IV

	<u>CÓDIGOS AMINOÁCIDOS</u>		
20	Alanina	Ala	A
	Aspártico	Asp	D
	Glutámico	Glu	E
	Glicina	Gly	G
25	Fenilalanina	Phe	F
	Leucina	Leu	L
	Serina	Ser	S
	Tirosina	Tyr	Y
	Cisteina	Cys	C
30	Triptófano	Trp	W
	Leucina	Leu	L
	Prolina	Pro	P
	Histidina	His	H
	Glutamina	Gln	Q
35	Arginina	Arg	R
	Isoleucina	Ile	I
	Metionina	Met	M
	Treonina	Thr	T
	Asparagina	Asn	N
40	Lisina	Lys	K
	Serina	Ser	S
	Arginina	Arg	R
	Valina	Val	V
45	Terminación	Ter	X

- 14 -

El dispositivo de ensayo (biochip) desarrollado en la invención consta de un soporte que presenta en su superficie toda una serie de sondas que se recogen en el listado de secuencias. Estas sondas oligonucleotídicas son capaces de hibridar con las secuencias mutadas contenidas en las Tablas I a III. La sistemática a utilizar sería la siguiente, para
5 cada una de las mutaciones.

Impresión de los portas de vidrio

- Se imprimen los oligonucleótidos capaces de detectar la mutación en un porta de vidrio aminosilanado empleando DMSO como tampón de impresión.
- 10 • La impresión se lleva a cabo con un "spotter" o impresor de oligonucleótidos en el que se controlan la temperatura y la humedad.

Procesamiento de los portaobjetos de vidrio

- Tras la impresión se somete a un tratamiento con radiación ultravioleta.
15

Preparación de la muestra a hibridar

- Se extrae el ADN del paciente a partir de una muestra de sangre de aproximadamente 300 µl mediante un protocolo de filtración.
- Se amplifican para dicho paciente todos los exones y el promotor del gen del receptor LDL, a través de PCR multiplex.
20
- En la misma reacción de amplificación se incorpora un nucleótido unido a biotina constituyendo un marcaje indirecto que requiere un revelado final con un complejo fluoróforo-estreptavidina.
 - Se comprueba en gel de agarosa que ha tenido lugar reacción de amplificación.
 - 25 ◦ Se somete a fragmentación la muestra a hibridar.
 - Se añade el tampón de hibridación.
 - Se procede a la desnaturalización durante 15 minutos a 95 °C.

Hibridación

- 30 • La hibridación se lleva a cabo automáticamente en la estación desarrollada para tal fin por Amersham Biosciences.
- Se prehibrida el portaobjetos.

- 15 -

- Se inyecta con una pipeta Hamilton la solución a hibridar.
- Se hibrida durante 1 hora.
- Se lava 3 veces con tampón de lavado.
- La estación procede al secado del soporte de vidrio.

5

Escaneado del portaobjetos

- Se introduce el portaobjetos en el escáner.
- Se procede a escanear la señal emitida por el marcaje estándar al ser excitado por el láser.

10

Cuantificación de la imagen

- El software del escáner nos permite cuantificar en la imagen obtenida la señal de los puntos donde se ha producido hibridación.
- A partir de la señal que se obtiene en los oligonucleótidos que detectan el alelo normal y el mutado establecemos la presencia o ausencia de la mutación en el paciente.

15

Cada mutación presenta en el portaobjetos cuatro oligonucleótidos repetidos 10 veces para su detección. Dos de ellos detectan el alelo normal y otros dos el mutado. La base interrogada se encuentra siempre en posición central.

20

En el caso de un paciente normal (Fig. 3A), no presenta alelo mutado. Por consiguiente en la imagen que se obtiene del soporte de vidrio los oligonucleótidos que detectan dicho alelo no presentan señal de hibridación o una señal menor que los oligonucleótidos que detectan el alelo normal.

25

Por el contrario, un individuo heterocigoto (Fig. 3B) para la mutación presenta el alelo normal y el mutado. De ahí que los oligonucleótidos que detectan el alelo normal y el mutado presentan una señal de hibridación equivalente.

30

Los resultados de la hibridación del ADN-chip con PCRs marcados, producidos a partir del ADN de los individuos a analizar, demuestran que el individuo representado en la Figura 3A no tiene una mutación puntual en el gen rLDL que ocasiona un cambio de aminoácido E256K, y que el individuo de la Figura 3B es heterocigoto para esa mutación. De esta forma el individuo heterocigoto quedaría diagnosticado genéticamente como hipercolesterolémico familiar.

A continuación se detallan mediante ejemplos el análisis de algunas de las

- 16 -

mutaciones detectadas con el dispositivo de ensayo de la invención.

EJEMPLO 1: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 1 del gen del r-LDL.

5 Se amplificó un fragmento de 215 pb del exón 1 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex1F (SEQ ID NO: 2) y Ex1R (SEQ ID NO: 3).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂,
10 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 74°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

15 Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP) y los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de
20 restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación (-23)A>C

Esta mutación crea un nuevo sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Ava II. Cinco microlitros del material amplificado del exón 1 se hidrolizaron con 15
25 unidades de Ava II en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 148 y 67 pb para el alelo normal y de 93, 55 y 67 para el alelo mutado, estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede
30 analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39.

- 17 -

La mutación (-23)A>C se encontró en una mujer de 60 años que presentaba arco corneal y xantelasmas, habiendo sido diagnosticada de hipercolesterolemia familiar con una puntuación de 8 según los criterios de diagnóstico del MedPed (Familial hypercholesterolemia. Report of a second WHO consultation. The International MedPed FH Organization, Geneva 1998). La historia familiar no reveló evidencia de enfermedad cardiovascular prematura en familiares de primer grado. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT) 352 mg/dL, c-LDL 271 mg/dL, y sus triglicéridos (TG) y colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) estaban dentro del rango de la normalidad. El tratamiento hipolipemiente con simvastatina (20mg/día) disminuyó su concentración de CT y c-LDL a 251 y 171 mg/dL respectivamente.

Análisis de la mutación L(-6)P

Esta mutación (47T>C, CTC>CCC, Leu(-6)Pro) se caracterizó mediante secuenciación automática del fragmento de 215 pb correspondiente al exón 1 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex1F (SEQ ID NO:2) y Ex1R (SEQ ID NO:3). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio T>C observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Se llevó a cabo su confirmación posterior por secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242 y SEQ ID NO: 243.

La mutación L(-6)P se encontró en una mujer de 47 años con arco corneal, cuyo padre tenía hipercolesterolemia con un CT de 350 mg/dL y dos tíos paternos con hipercolesterolemia habían fallecido de infarto de miocardio a los 24 y 33 años respectivamente. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una

- 18 -

puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 420 mg/dL, c-LDL 320 mg/dL, TG 155mg/dL y c-HDL 49 mg/dL. El tratamiento hipolipemiante con atorvastatina (15mg/día) redujo su concentración de CT y c-LDL a 289 y 233 mg/dL respectivamente.

5

Análisis de la mutación G(-2)R

Esta mutación (58G>A, GGG>AGG, Gly(-2)Arg) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 215 pb correspondiente al exón 1 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex1F (SEQ ID NO:2) y Ex1R (SEQ ID NO:3). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio G>A observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 222 y SEQ ID NO: 223.

La mutación G(-2)R se encontró en una mujer de 34 años con arco corneal, cuya madre presentaba hipercolesterolemia con un CT de 400 mg/dL. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar en esta paciente alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 10 puntos. Sus concentraciones plasmáticas de lípidos antes del inicio del tratamiento farmacológico fueron: CT de 354 mg/dL, c-LDL de 264 mg/dL, con TG dentro de la normalidad y c-HDL de 64 mg/dL.

EJEMPLO 2: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 2 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 183 pb del exón 2 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex2F (SEQ ID NO: 4) y Ex2R (SEQ ID NO: 5).

- 19 -

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron:

5 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP) y los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

15 Análisis de la mutación 108delC

Esta mutación crea un nuevo sitio de reconocimiento para la enzima de restricción MnlI. Quince microlitros del material amplificado del exón 1 se hidrolizaron con 15 unidades de MnlI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos que se obtuvieron

20 tenían un tamaño de 150 y 33 pb para el alelo normal y de 118, 33 y 32 para el alelo mutado; estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43.

25 La mutación 108delC se encontró en una mujer de 50 años sin ninguna sintomatología clínica, fue diagnosticada de hipercolesterolemia familiar con una puntuación de 9 puntos según los criterios de diagnóstico del MedPed. La historia familiar mostró que un familiar en primer grado había tenido enfermedad cardiovascular prematura. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico

30 fueron: CT 381 mg/dL, c-LDL 321 mg/dL, TG 142 mg/dL y c-HDL 32 mg/dL.

- 20 -

Análisis de la mutación T41M

Esta mutación (185C>T, ACG>ATG, Thr41Met) destruye un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Tai*I. Quince microlitros del material amplificado del exón 2 se hidrolizaron con 15 unidades de *Tai*I en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 154 y 29 pb para el alelo normal y de 183 pb para el alelo mutado que corresponde al tamaño del material amplificado, estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142 y SEQ ID NO: 143.

La mutación T41M se detectó en un hombre de 69 años que había tenido un infarto de miocardio a la edad de 55 años, y que había sido diagnosticado clínicamente de hipercolesterolemia familiar: 6 puntos según los criterios de diagnóstico del MedPed. El paciente tenía historia familiar de enfermedad coronaria prematura. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 274 mg/dL, c-LDL 217 mg/dL y sus triglicéridos (TG) y colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) estaban dentro del rango de la normalidad.

Análisis de la mutación C42Y

Esta mutación C42Y (188G>A, TGC>TAG, Cys42Tyr) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 183 pb correspondiente al exón 2 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex2F (SEQ ID NO:4) y Ex2R (SEQ ID NO:5) Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio G>A observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo

- 21 -

descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250 y SEQ ID NO: 251.

La mutación C42Y se encontró en un varón de 17 años que presentaba arco corneal, y cuya madre tenía una hipercolesterolemia grave. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 10 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 350 mg/dL, con niveles de TG y c-HDL dentro de la normalidad. El tratamiento hipolipemiente con simvastatina (20 mg/día) disminuyó su concentración de CT y c-LDL a 274 y 214 mg/dL respectivamente.

10

Análisis de la mutación C74Y

Esta mutación C74Y (284 G>A, TGC>TAC, Cys74Tyr) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 196 pb correspondiente al exón 3 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex3F (SEQ ID NO:6) y Ex3R (SEQ ID NO:7). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio observado G>A se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 214 y SEQ ID NO: 215.

15

20

25

30

La mutación C74Y se encontró en un varón de 52 años que presentaba arco corneal y xantomas tendinosos con historia familiar de hipercolesterolemia en la infancia. Fue diagnosticado de hipercolesterolemia familiar con una puntuación según los criterios del MedPed de 17 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 420 mg/dL, TG 96 mg/dl y c-HDL 69 mg/dl. El tratamiento con un inhibidor de la HMG-CoA reductasa a dosis de 10 mg/día redujo su cifra de c-LDL en un 22%.

- 22 -

EJEMPLO 3: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 3 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 196 pb del exón 3 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex3F (SEQ ID NO:6) y Ex3R (SEQ ID NO: 7).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

20 Análisis de la mutación 191-2delAinsCT

Como esta mutación no cambia el mapa de restricción, se diseñó y se sintetizó un desoxioligonucleótido con una base desapareada que introduce un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BfaI en presencia del alelo normal y que desaparece en presencia del alelo mutado.

Se amplificó un fragmento de 184 pb del exón 3 por la técnica de PCR utilizando los desoxioligonucleótidos Ex3R (SEQ ID NO: 7) y Mut191-2F (SEQ ID NO: 8).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C

- 23 -

durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72° C durante 10 minutos.

Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de BfaI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 161 y 23 pb para el alelo normal y de 185 pb para el alelo mutado que corresponde al tamaño del material amplificado, estos fragmentos, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 47.

La mutación 191-2delAinsCT se encontró en dos familias aparentemente no relacionadas con hipercolesterolemia familiar de herencia autosómica dominante. El probando de una familia era una mujer de 58 años con xantomas tendinosos, xantelasmas y angina de pecho y con historia familiar de enfermedad coronaria e hipercolesterolemia. Fue diagnosticada de hipercolesterolemia familiar con una puntuación según los criterios del MedPed de 15 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del inicio del tratamiento farmacológico fueron: CT 559 mg/dL, c-LDL 467 mg/dL, TG 175 mg/dL y c-HDL 57 mg/dL. El tratamiento hipolipemiente con simvastatina (40mg/día) disminuyó su concentración de CT y c-LDL a 302 y 228 mg/dL respectivamente.

Análisis de la mutación N59K

Esta mutación (240C>A, AAC>AAA, Asn59Lys) destruye un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción HincII. Quince microlitros del material amplificado del exón 3 se hidrolizaron con 15 unidades de HincII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 111 y 85 pb para el alelo normal y de 196 pb para el alelo mutado que corresponde al tamaño del material amplificado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

- 24 -

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 51.

La mutación se detectó en un hombre de 43 años diagnosticado clínicamente de hipercolesterolemia familiar con una puntuación de 12 según criterios del MedPed. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del inicio de tratamiento farmacológico fueron: CT 465 mg/dL, c-LDL 397 mg/dL, TG 100 mg/dL y c-HDL 48 mg/dL. El tratamiento hipolipemiente con simvastatina (40mg/día) disminuyó su concentración de CT y c-LDL a 350 y 282 mg/dL respectivamente. Su madre había sufrido un infarto de miocardio a la edad de 58 años y el probando tenía un hijo de 8 años con hipercolesterolemia (CT 325 mg/dL y c-LDL 241 mg/d).

Análisis de la mutación 231delC

Esta mutación destruye un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción HaeIII. Quince microlitros del material amplificado del exón 3 se hidrolizaron con 15 unidades de HaeIII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 76, 51, 41 y 25 pb para el alelo normal y de 117, 51 y 27 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 55.

La mutación se detectó en una mujer de 37 años que presentaba arco corneal y que había sido diagnosticada de hipercolesterolemia familiar con una puntuación de 16 puntos según criterios del programa de la OMS, MedPed. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 543 mg/dL, c-LDL 456 mg/dL, TG 178 mg/dL y c-HDL 51 mg/dL. El tratamiento hipolipemiente combinado con atorvastatina (40 mg/día) y colestipol (20 g/día) disminuyó su concentración de CT y c-LDL a 260 y 190 mg/dL respectivamente. Un hermano había tenido infarto de miocardio a la edad de 38 años, y uno de sus hijos de 12 años era hipercolesterolémico con una concentración de CT de 305 mg/dL.

- 25 -

Análisis de la mutación 313+1insT

Esta mutación crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción TruI. Quince microlitros del material amplificado del exón 3 se hidrolizaron con 15 unidades de TruI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos resultantes de esta hidrólisis tenían un tamaño de 196 pb para el alelo normal y de 162 y 34 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa NuSieve al 3% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 59.

La mutación 313+1insT se detectó en una mujer de 53 años con xantomas tendinosos y arco corneal. No se observó historia familiar de enfermedad coronaria prematura en sus familiares en primer grado. Según los criterios clínicos de hipercolesterolemia del MedPed esta mujer tenía una puntuación de 19. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 574 mg/dL, c-LDL 505 mg/dL y con TG y c-HDL estaban dentro del rango de la normalidad. El tratamiento hipolipemiente combinado con simvastatina (80 mg/día) y colestipol (20 g/día) redujo su concentración de CT y c-LDL a 286 y 225 mg/dL, respectivamente.

20

EJEMPLO 4: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 4A del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 242 pb de la zona 5' del exón 4 (4A) por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos: Ex4AF (SEQ ID NO: 9) y Ex4AR (SEQ ID NO: 10).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 63°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

30

- 26 -

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia
5 de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación 338del16

Esta mutación crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción
10 Van91I. Quince microlitros del material amplificado del exón 4A se hidrolizaron con 15 unidades de Van1I en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 242 pb para el alelo normal y de 194 y 52 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al
15 2% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146 y SEQ ID NO: 147.

La mutación 338del16 se encontró en tres familias no relacionadas con
20 hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando de una de estas familias era un varón de 40 años con xantomas tendinosos y arco corneal, CT 542 mg/dL y c-LDL de 441 mg/dL, con TG y c-HDL normales. La puntuación para el diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar según el MedPed fue de 19 puntos. No se observó que hubiese historia familiar de enfermedad coronaria prematura. El tratamiento
25 hipolipemiente con atorvastatina (10 mg/día) redujo su concentración de CT y c-LDL a 293 y 218 mg/dL, respectivamente.

Análisis de la mutación 509insC

Como esta mutación no cambia el mapa de restricción, se diseñó y se sintetizó un
30 desoxioligonucleótido con tres bases desapareadas, una de las cuales crea un sitio de reconocimiento par la enzima de restricción MnlI en presencia del alelo mutado pero no desaparece en presencia del alelo normal.

- 27 -

Se amplificó un fragmento de 244 pb del exón 4A por la técnica de PCR utilizando el desoxioligonucleótido Ex4AF (SEQ ID NO: 9) y el desoxioligonucleótido Mut509insCR (SEQ ID NO: 11).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con
5 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂,
200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq
ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron:
10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C
durante 1 minuto, hibridación a 65°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2
10 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de
MnII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante
(Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un
tamaño de 141, 99 y 4 pb para el alelo normal y de 141, 88, 12 y 4 pb para el alelo
15 mutado. estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%
y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito
("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO:
61, SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 63.

20 La mutación 509insC se encontró en una mujer de 44 años con
hipercolesterolemia CT 477 mg/dL y c-LDL 394 mg/dL con TG y c-HDL normales, sin
historia familiar ni personal de enfermedad coronaria. El diagnóstico clínico según
criterios del MedPed alcanzó una puntuación de 9. Dos de sus hermanos tenían
hipercolesterolemia con una concentración de c-LDL por encima del percentil 95.

25

Análisis de la mutación 451del3

Esta mutación fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento
de 242 pb correspondiente al exón 4 (4A) del gen del rLDL al analizar este fragmento en
pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de
30 secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando
el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman
(Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex4AF (SEQ ID NO:9) y

- 28 -

Ex4AR (SEQ ID NO:10). La posterior electroforesis en secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. Esta delección de tres nucleótidos se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174 y SEQ ID NO: 175.

La mutación 451del3 se encontró en un varón de 36 años que presentaba arco corneal y que había padecido un infarto de miocardio a los 34 años de edad. Este paciente tenía dos hijos de 2 y 8 años de edad con hipercolesterolemia grave con cifras de CT de 320 y 375 mg/dL respectivamente. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar de este paciente alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 17 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes de iniciar del tratamiento farmacológico hipolipemiente fueron: CT 449 mg/dL, c-LDL 367 mg/dL, TG 218 mg/dL y c-HDL 38 mg/dL. El tratamiento con simvastatina (40 mg/día) disminuyó su cifra de c-LDL a 270 mg/dL.

EJEMPLO 5: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 4B del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 237 pb de la zona 3' del exón 4 (4B) por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex4BF (SEQ ID NO: 12) y Ex4BR (SEQ ID NO: 13).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia

- 29 -

de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación D157G

5 Esta mutación (533A>G, GAT>GGT, Asp157Gly) crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción HphI. Quince microlitros del material amplificado del exón 4B se hidrolizaron con 15 unidades de HphI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 237 pb correspondiente al
10 material amplificado sin digerir para el alelo normal y de 175 y 62 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa NuSieve al 3% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO:
15 67.

La mutación D157G se encontró en una mujer de 32 años con hipercolesterolemia, sin historia familiar ni personal de enfermedad coronaria. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 6. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento
20 farmacológico fueron: CT 358 mg/dL y c-LDL 296 mg/dL, con niveles de TG y c-HDL de 57 y 61 mg/dL, respectivamente. El tratamiento con atorvastatina (10 mg/día) redujo su colesterol total a 212 mg/dL y su c-LDL a 140 mg/dL. Su familia paterna presentaba historia de hipercolesterolemia: El padre con CT de 364 mg/dL, y la abuela y un tío paterno con CT de 341 mg/dL y 320 mg/dL, respectivamente.

25

Análisis de la mutación C195R

Esta mutación (646T>C, TGT>CGT, Cys195Arg) crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BshNI. Quince microlitros del material amplificado del exón 4B se hidrolizaron con 15 unidades de BshNI en un volumen final de 30 µl según
30 las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 237 pb, correspondiente al material amplificado sin digerir, para el alelo normal y de 159 y 78 pb para el alelo mutado. Estos

- 30 -

fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70 y SEQ ID NO: 71.

5 La mutación C195R se detectó en una mujer de 64 años con arco corneal, con hipercolesterolemia e historia familiar de enfermedad coronaria prematura en su madre. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar fue clasificado de seguro con una puntuación según criterios del MedPed de 11. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 560 mg/dL y c-LDL 468 mg/dL con niveles de
10 TG y c-HDL dentro del rango de la normalidad.

Análisis de la mutación 675del15

Esta mutación se puede identificar por análisis de heteroduplex. La electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% del material de PCR amplificado del exón 4B cuando
15 existe mutación muestra la presencia de bandas de heteroduplex de un aparente mayor tamaño molecular que las dos bandas homoduplex de 237 y 222 pb, fácilmente distinguibles en el gel después de la tinción con bromuro de etidio. Las dos bandas de los heteroduplex que se forman migran a velocidad mas lenta como consecuencia de la formación de los abultamientos entre las secuencias no apareadas. Alternativamente, esta
20 mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 y SEQ ID NO: 75.

La mutación 675del15 se detectó en una mujer de 63 años con hipercolesterolemia, sin historia familiar de enfermedad coronaria prematura. Su
25 diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 8 puntos siendo clasificado de seguro. No se pudo conseguir la colaboración sus familiares para realizar el estudio lipídico y genético. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 450 mg/dL y c-LDL 379 mg/dL con niveles de TG y c-HDL dentro del rango de la normalidad.

30

- 31 -

Análisis de la mutación 684dup12

Esta mutación se analizó por digestión del fragmento amplificado del exón 4B con la endonucleasa de restricción MnlI. La adición de 12 pb adicionales que produce la mutación permite detectar la presencia de la mutación en el material amplificado del exón 4B por electroforesis en poliacrilamida al 8% y tinción del gel con bromuro de etidio. Adicionalmente, quince microlitros del material amplificado del exón 4B se hidrolizaron con 15 unidades de MnlI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 192 y 45 pb para el alelo normal y de 204 y 45 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 79.

La mutación 684dup12 se detectó en dos familias no relacionadas con hipercolesterolemia de herencia autosómica dominante. El probando de una de estas familias era un hombre de 63 años con xantomas tendinosos y arco corneal, que había sufrido un infarto de miocardio a la edad de 55 años. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 17 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 469 mg/dL y c-LDL 408 mg/dL, con niveles de TG de 100 mg/dL y c-HDL de 41 mg/dL.

Análisis de la mutación D200V

Esta mutación D200V (662A>T, GAC>GTC, Asp200Val) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 237 pb correspondiente al exón 4B del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex4BF (SEQ ID NO:12) y Ex4BR (SEQ ID NO:13). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador

- 32 -

automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio observado A>T se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234 y SEQ ID NO: 235.

La mutación D200V se encontró en una familia con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando era una mujer de 43 años con historia familiar de hipercolesterolemia en la infancia y cuya madre y hermano presentaban niveles de c-LDL por encima del percentil 95. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar en esta paciente alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 8 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos bajo tratamiento farmacológico (Pravastatina, 40 mg/dL) fueron: CT 329 mg/dL, TG 73 mg/dl y c-HDL de 41 mg/dl y unos niveles de c-LDL de 273 mg/dL.

15 Análisis de la mutación S205C

La mutación S205C (677C>G, TCT>TGT, Ser205Cys) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 237 pb correspondiente al exón 4B del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos suministrados en el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex4BF (SEQ ID NO:12) y Ex4BR (SEQ ID NO:13). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio C>G observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 230 y SEQ ID NO: 231.

La mutación S205C se encontró en una mujer de 39 años con historia familiar de hipercolesterolemia (madre y hermano con niveles de CT de 450 y 500 mg/dL respectivamente) y con 2 hijos con CT por encima del percentil 95. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, realizado a los 20 años, alcanzó una puntuación según

- 33 -

criterios del MedPed de 8 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 390 mg/dL, 150 mg/dL y c-HDL 35 mg/dL y unos niveles de c-LDL de 325 mg/dL. El tratamiento con simvastatina (10 mg/día) disminuyó su cifra de c-LDL a 270 mg/dL.

5

EJEMPLO 6: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 6 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 179 pb del exón 6 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex6F (SEQ ID NO: 14) y Ex6R (SEQ ID NO: 15).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 56°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP): los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación C255G

Como esta mutación (826T>G, TGC>GGC, Cys255Gly) no cambia el mapa de restricción, se diseñó y se sintetizó un desoxioligonucleótido con una base desapareada que introduce un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BstUI en presencia del alelo mutado, que desaparece en presencia del alelo normal.

Se amplificó un fragmento de 163 pb del exón 6 por la técnica de la PCR utilizando los desoxioligonucleótidos Ex6R (SEQ ID NO: 15) y MutC255GF (SEQ ID NO: 16).

- 34 -

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron:

5 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 63°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de BstUI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante

10 (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 163 pb para el alelo normal y de 141 y 22 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID

15 NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82 y SEQ ID NO: 83.

La mutación C255G se encontró en una mujer de 63 años con historia familiar de hipercolesterolemia familiar. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 8 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 439 mg/dL y c-LDL 355

20 mg/dL con niveles de TG y c-HDL dentro del rango de la normalidad.

Análisis de la mutación E291X

Como esta mutación (934G>T, GAG>TAG, Asp291Stop) no cambia el mapa de restricción, se diseñó y se sintetizó un desoxioligonucleótido con una base desapareada

25 que crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción SspI en presencia del alelo mutado que desaparece en presencia del alelo normal.

Se amplificó un fragmento de 164 pb del exón 6 por la técnica de PCR utilizando el desoxioligonucleótido Ex6F (SEQ ID NO: 13) y el desoxioligonucleótido Mut E291XR (SEQ ID NO: 17).

30 La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq

- 35 -

ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

5 Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de SspI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 164 pb (fragmento no digerido) para el alelo normal y de 144 y 20 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en
10 geles de agarosa NuSieve al 3% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 y SEQ ID NO: 87.

15 La mutación E291X se encontró en una familia con hipercolesterolemia familiar autosómica dominante. El probando era un varón de 44 años con arco corneal con concentraciones de CT de 381 mg/dL, c-LDL de 314, TG 111mg/dL y c-HDL 45 mg/dL. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 12 puntos. El tratamiento hipolipemiante combinado con
20 simvastatina (40 mg/día) y colestiramina (12 g/día) redujo su colesterol plasmático a 253 mg/dL y su c-LDL a 188 mg/dL.

Análisis de la mutación 818del8

25 Esta mutación se pudo identificar por análisis de heterodúplex. La electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% del material de PCR amplificado del exón 6 cuando existe mutación muestra la presencia de dos banda heterodúplex de un aparente mayor tamaño molecular que las dos bandas homodúplex de 179 y 171 pb, fácilmente distinguibles en el gel después de la tinción con bromuro de etidio. Las dos bandas de los heterodúplex que se forman migran a velocidad más lenta como consecuencia de la
30 formación de los abultamientos entre las secuencias no apareadas.

Adicionalmente, esta mutación puede ser caracterizada por digestión del producto amplificado correspondiente al exón 6 del gen del rLDL con la endonucleasa de

- 36 -

restricción MaeIII; quince microlitros del material amplificado del exón 4B se hidrolizaron con 15 unidades de MaeIII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 118, 34 y 27 pb para el alelo normal y de 118 y 53 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162 y SEQ ID NO: 163.

La mutación 818del8 se encontró en una mujer de 69 años con dos hijos con cifras de CT de 382 y 304 mg/dL respectivamente y con evidencia de enfermedad cardiovascular prematura. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 10 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 530 mg/dL, c-LDL 439 mg/dL, TG 170 mg/dL y c-HDL 57 mg/dL. El tratamiento con cerivastatina (0,4 mg/día) disminuyó su cifra de c-LDL a 363 mg/dL.

Análisis de la mutación R279G

Esta mutación R279G (898A>G, AGA>GGA, Arg279Gly) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 179 pb correspondiente al exón 6 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se realizó en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex6F (SEQ ID NO: 14) y Ex6R (SEQ ID NO: 15). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio A>G observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 202 y SEQ ID NO: 203.

- 37 -

La mutación R279G se encontró en una mujer de 59 años con xantelasmas e historia familiar de hipercolesterolemia en padre y dos hermanos. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 8 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 384 mg/dL, c-LDL 314 mg/dl, con TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con simvastatina (80 mg/dl) redujo su concentración de c-LDL a 167 mg/dL.

EJEMPLO 7: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 7 del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 234 pb del exón 7 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex7F (SEQ ID NO: 18) y Ex7R (SEQ ID NO: 19).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 57°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación 941-39C>T

Esta mutación elimina un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción ApaI. Quince microlitros del material amplificado del exón 7 se hidrolizaron con 15 unidades de ApaI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 186, 26 y 22 pb para el alelo normal y de 208 y 26 pb para

- 38 -

el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90 y SEQ ID NO: 91.

La mutación 941-39C>T se detectó en cuatro familias no relacionadas que presentaban la característica común de tener una hipercolesterolemia familiar autosómica dominante. El probando de una de estas familias era una mujer de 61 años que había sufrido un infarto de miocardio y con historia familiar de enfermedad coronaria prematura. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 7 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 340 mg/dL, c-LDL 248 mg/dL con TG de 136 mg/dL y c-HDL 65 mg/dL. Tras el tratamiento con 20 mg/día de atorvastatina el CT se redujo a 223 mg/dL y el c-LDL a 144 mg/dL, sin cambios significativos en sus cifras de TG y c-HDL.

Análisis de la mutación C319Y

Esta mutación (1019G>A, TGC>TAC, Cys319Tyr) crea un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción RsaI. Quince microlitros del material amplificado del exón 7 se hidrolizaron con 15 unidades de RsaI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 234 (fragmento sin digerir) para el alelo normal y de 136 y 98 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94 y SEQ ID NO: 95.

La mutación C319Y se detectó en una familia con hipercolesterolemia familiar autosómica dominante. El probando era un hombre de 43 años con xantomas tendinosos en tendón de Aquiles y en los tendones extensores de las manos y arco corneal y que tenía un hijo de 17 años con colesterol total plasmático de 384 mg/dL. Su padre había fallecido de muerte súbita a los 45 años. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia

- 39 -

familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 22 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 428 mg/dL, c-LDL 372 mg/dL, estando el nivel de TG dentro del rango de la normalidad.

5 **Análisis de la mutación 1054del11**

Esta mutación destruye un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción HphI. Quince microlitros del material amplificado del exón 7 se hidrolizaron con 15 unidades de HphI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron
10 tenían un tamaño de 189 y 45 pb para el alelo normal y de 223 para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 99.

15 La mutación 1054del11 se detectó en una familia con hipercolesterolemia familiar autosómica dominante. El probando era un hombre de 43 años con xantomas aquileos tendinosos y con un familiar en primer grado con enfermedad coronaria prematura. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 16 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin
20 tratamiento farmacológico fueron: CT 480 mg/dL, c-LDL 416 mg/dL, TG en 95 mg/dL y c-HDL 36 mg/dL.

EJEMPLO 8: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 8 del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 220 pb del exón 8 por la técnica de la reacción en
25 cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex 8F (SEQ ID NO: 148) y EX8R (SEQ ID NO: 149).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂,
200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq
30 ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96° C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94° C

- 40 -

durante 1 minuto, hibridación a 64° C durante 1 minuto y elongación a 72° C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72° C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ
5 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

10 Análisis de la mutación 1186+5 G>A

Esta mutación fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 220 pb correspondiente al exón 8 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando
15 los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex8BF (SEQ ID NO: 148) y Ex8BR (SEQ ID NO: 149).

Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio
20 G>A observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190 y SEQ ID NO: 191.

Esta mutación se encontró en dos familias no relacionadas con
25 hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando de una de ellas era una mujer de 45 años que presentaba arco corneal, xantomas tendinosos, xantelasmas e historia familiar de hipercolesterolemia. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 21 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT)
30 de 411 mg/dL, c-LDL de 346 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante con Cerivastatina (0,2 mg/día) redujo su cifra de c-LDL a 222 mg/dL.

- 41 -

EJEMPLO 9: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 9 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 224 pb del exón 9 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex9F (SEQ ID NO: 20) y Ex9R (SEQ ID NO: 21).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 63°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación 1197del9

Esta mutación se puede analizar por análisis de heteroduplex. La electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% del material de PCR amplificado del exón 9 en presencia de esta mutación muestra dos bandas heteroduplex de un aparente mayor tamaño molecular que las bandas homoduplex de 224 y 215 pb que pueden distinguirse en el gel después de la tinción con bromuro de etidio. Las dos bandas de los heteroduplex que se forman migran a velocidad más lenta como consecuencia de la formación de los abultamientos entre las secuencias no apareadas. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 103.

La mutación 1197del9 se encontró en ocho familias no relacionadas que presentaban la característica común de tener una hipercolesterolemia familiar autosómica

- 42 -

dominante. El probando de una de estas familias era una mujer de 45 años con xantomas tendinosos y que había tenido un angina de pecho a los 41 años. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 18 puntos. Su padre sufrió un infarto de miocardio a los 36 años. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 525 mg/dL, c-LDL 443 mg/dL, TC 153 mg/dL y c-HDL 49 mg/dL. El tratamiento con atorvastatina (20 mg/día) redujo su CT a 323 mg/dL.

Análisis de la mutación Y379X

Esta mutación (1200C>A, TAC>TAA, Tyr379Stop) destruye un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción MnlI. Quince microlitros del material amplificado del exón 9 se hidrolizaron con 15 unidades de MnlI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 87, 56, 34, 22, 18, 4, y 3 pb para el alelo normal y de 87, 56, 38, 22, 18 y 3 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 16%, de esta forma se pudo distinguir las bandas de 34 y 38 pb que diferencian ambos alelos por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 107.

La mutación Y379X se encontró en una familia con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando de una de esta familia era un varón de 69 años. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 7 puntos. Su padre había fallecido de infarto de miocardio a los 50 años y tenía dos hijos con colesterol total plasmático por encima del percentil 95. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 381 mg/dL, c-LDL 306 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL normales. Tras el tratamiento hipolipemiente con atorvastatina (20 mg/día) su CT plasmático descendió a 259 mg/dL.

30

- 43 -

Análisis de la mutación 1207delT

Esta mutación destruye un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción MboII. Quince microlitros del material amplificado del exón 9 se hidrolizaron con 15 unidades de MboII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 140, 46, 35 y 3 para el alelo normal y de 140, 48 y 35 para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 16%, mediante tinción con bromuro de etidio se pudo distinguir las bandas de 46 y 48 pb que diferencian ambos alelos. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO. 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110 y SEQ ID NO: 111.

La mutación 1207delT se encontró en una familia con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando era una mujer de 35 años. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 429 mg/dL, c-LDL 345 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL de 188 y 46 mg/dL respectivamente. El tratamiento hipolipemiente combinado con 40 mg/día de simvastatina y 5 g/día de colestipol redujo el CT a 220 mg/dL y el c-LDL a 137 mg/dL, sin cambios significativos en sus cifras de TG y c-HDL.

Análisis de la mutación Y421X

Esta mutación (1326C>G, TAC>TAG, Tyr421Stop) crea un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción BfaI. Quince microlitros del material amplificado del exón 9 se hidrolizaron con 15 unidades de BfaI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 224 (fragmento sin digerir) para el alelo normal y de 164 y 60 para el alelo mutado: Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

- 44 -

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114 y SEQ ID NO: 115.

La mutación Y421 se encontró en tres familias no relacionadas que presentaban la característica común de tener una hipercolesterolemia familiar autosómica dominante. El probando de una de estas familias era una mujer de 71 años con xantomas tendinosos, xantelasmas y arco corneal. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 16 puntos. Su padre sufrió un infarto de miocardio a los 51 años y tenía un hijo con hipercolesterolemia acusada (CT 367 mg/dL). Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 615 mg/dL, c-LDL 550 mg/dL, con TC y c-HDL dentro del rango de la normalidad.

Análisis de la mutación 1204insT

Esta mutación elimina un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción MboII. Quince microlitros del material amplificado del exón 9 se hidrolizaron con 15 unidades de MboII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 141, 45, 35 y 3 pb para el alelo normal y de 141, 45 y 39 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170 y SEQ ID NO: 171.

La mutación 1204insT se encontró en una niña de 12 años cuyo padre presentaba unos niveles de CT de 412 mg/dl y su hermano de 7 años un CT de 321 mg/dL. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT) de 332 mg/dL, c-LDL de 267 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con resinas (15 g/día) redujo su cifra de c-LDL a 248 mg/dL.

EJEMPLO 10: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 10.

Se amplificó un fragmento de 278 pb del exón 10 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes desoxioligonucleótidos Ex10F (SEQ ID NO: 22) y Ex10R (SEQ ID NO: 23).

5 La reacción de amplificación se llevó acabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C
10 durante 1 minuto, hibridación a 58°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ
15 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación 1432delG

20 Como esta mutación no cambia el mapa de restricción, se diseñó y se sintetizó un desoxioligonucleótido con una base desapareada que crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción NaeI en presencia del alelo mutado que desaparece en presencia del alelo normal.

Se amplificó un fragmento de 200 pb del exón 10 por la técnica de PCR
25 utilizando el desoxioligonucleótido Ex10R (SEQ ID NO: 23) y el desoxioligonucleótido con la base desapareada Mut1432delGF (SEQ ID NO: 24).

La reacción de amplificación se llevó acabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq
30 ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C

- 46 -

durante 1 minuto, hibridación a 58°C durante 1 minuto y elongación a 72 °C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Quince microlitros del material amplificado del exón 10 se hidrolizaron con 15 unidades de NaeI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 200pb (fragmento sin digerir) para el alelo normal y de 179 y 20pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118 y SEQ ID NO: 119.

La mutación 1432delG se encontró en una familia con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando era una mujer de 53 años con xantomas tendinosos y que había sufrido un infarto de miocardio, presentando además historia familiar de enfermedad coronaria prematura. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 15 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 548 mg/dL, c-LDL 470 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL normales.

20 Análisis de la mutación T433N

Esta mutación T433N (1361C>A, ACC>AAC, Tyr433Asn) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 278 pb correspondiente al exón 10 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se desarrolló en termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex10F (SEQ ID NO: 22) y Ex10R (SEQ ID NO: 23). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio observado C>A se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo

- 47 -

descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158 y SEQ ID NO: 159.

La mutación T433N se encontró en un varón de 50 años con arco corneal y con historia paterna de hipercolesterolemia y una hija de 21 años con niveles de CT de 310 mg/dL. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 6 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del inicio del tratamiento farmacológico fueron: CT 318 mg/dL, c-LDL 249 y con concentraciones de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con lovastatina (20 mg/día) descendió su cifra de c-LDL a 199 mg/dL.

Análisis de la mutación T446I

La mutación T446I (1400C>T, ACC>ATC, Tyr446Ile) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 278 pb correspondiente al exón 10 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex10F (SEQ ID NO: 22) y Ex10R (SEQ ID NO: 23). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio C>T observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 206 y SEQ ID NO: 207.

La mutación T446I se encontró en una mujer de 64 años con antecedentes de enfermedad cardiovascular prematura (angor a los 62 años) y con dos hermanos hipercolesterolémicos que habían sufrido un infarto de miocardio a la edad de 40 y 46 años respectivamente. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos bajo tratamiento farmacológico (Pravastatina) fueron: CT de 352 mg/dL, c-LDL de 281 mg/dl y niveles de TG y c-HDL normales. Posteriormente, el tratamiento

- 48 -

hipolipemiente con Simvastatina (20mg/día) se disminuyó su cifra de c-LDL a 150 mg/dL.

Análisis de la mutación 1423delGC/insA

5 Esta mutación elimina un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción MvaI. Quince microlitros del material amplificado del exón 10 se hidrolizaron con 15 unidades de MvaI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 150 y 128 pb para el alelo normal y de 128, 87 y 63 pb
10 para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166 y SEQ ID NO: 167.

15 La mutación 1423delGC/insA se encontró en un varón de 34 años con historia paterna de hipercolesterolemia. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT) de 554 mg/dL, c-LDL de 422 mg/dl y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento
20 hipolipemiente administrado (Atorvastatina 10 mg/día) tan sólo disminuyó su cifra de c-LDL a 406 mg/dl.

EJEMPLO 11: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 11 del gen del r-LDL.

25 Se amplificó un fragmento de 194 pb del exón 11 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex11F (SEQ ID NO: 25) y Ex11R (SEQ ID NO: 26).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂,
30 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minuto de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C

- 49 -

durante 1 minuto, hibridación a 65°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

10 Análisis de la mutación W515X

Esta mutación (1607G>A, TGG>TAG, Trp515Stop) crea un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción BfaI. Quince microlitros del material amplificado del exón 9 se hidrolizaron con 15 unidades de BfaI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 164 y 30 pb para el alelo normal y de 97, 67 y 30pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa NuSieve al 3%, y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122 y SEQ ID NO: 123.

La mutación W515X se encontró en un hombre de 39 años con arco corneal, cuyo padre con hipercolesterolemia había tenido un infarto de miocardio a los 50 años. Su diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 13 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 364 mg/dL, c-LDL 308 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL normales. El padre del probando, dos hermanos y un hijo tenían cifras de colesterol por encima del percentil 95.

Análisis de la mutación [1587-5del5; 1587del31]

La mutación [1587-5del5; 1587del31] fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 194 pb correspondiente al exón 10 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia

- 50 -

familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex11F (SEQ ID NO: 25) y Ex11R (SEQ ID NO: 26).

5 Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. Esta
deleción se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% tras la que pudieron
observarse bandas de 194 y 158 pb correspondientes al alelo normal y mutado
respectivamente. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo
10 descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 256, SEQ
ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 y SEQ ID NO: 259.

La mutación [1587-5del5; 1587del31] se encontró en un varón de 43 años con
arco corneal, historia de hipercolesterolemia en la familia (padre e hijo con
hipercolesterolemia) y evidencia de enfermedad cardiovascular en la familiar (padre
15 sufrió un infarto agudo de miocardio a los 50 años). El diagnóstico clínico de
hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9
puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico
fueron: Colesterol total (CT) de 345 mg/dL con niveles de TG de 160 mg/dl y c-HDL de
34 mg/dl. El tratamiento hipolipemiente combinada con Simvastatina (40 mg/día) y
20 colestipol (10 g/día) disminuyó su cifra de CT a 208 mg/dl.

Análisis de la mutación g516x

Esta mutación (1609G>T, GGA>TGA, Gly516Stop) introduce un sitio de
reconocimiento para la endonucleasa de restricción HphI. Quince microlitros del material
25 amplificado del exón 11 se hidrolizaron con 15 unidades de HphI en un volumen final de
30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los
fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 139, 43 y 12 pb para el alelo
normal y de 81, 58, 43 y 12 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por
electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con
30 bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo
descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 176, SEQ
ID NO: 177, SEQ ID NO: 178 y SEQ ID NO: 179.

- 51 -

La mutación G516X se encontró en una mujer de 20 años con xantomas tendinosos e historia de hipercolesterolemia en la familia (madre y dos hermanos adolescentes con niveles de c-LDL por encima del percentil 95). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 17 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 476 mg/dL, c-LDL 403 mg/dl y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con un inhibidor de la HMG-CoA reductasa disminuyó su cifra de c-LDL a 202 mg/dL.

10 Análisis de la mutación H562Q

Esta mutación (1749C>A, CAC>CAA, His562Gln) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 194 pb correspondiente al exón 10 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex11F (SEQ ID NO: 25) y Ex11R (SEQ ID NO: 26). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio observado C>A se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 210 y SEQ ID NO: 211.

La mutación H562Q se encontró en una mujer de 37 años con historia de hipercolesterolemia y enfermedad coronaria en la familia (padre con hipercolesterolemia e IAM a los 48 años e hijo de 13 años con 500 mg/dl de CT). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT) de 350 mg/dL con niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con Atorvastatina (20 mg/día) disminuyó su cifra de CT a 333 mg/dl.

EJEMPLO 12: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 12 del r-LDL

Se amplificó un fragmento de 236 pb del exón 12 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex12F (SEQ ID NO: 150) y Ex12R (SEQ ID NO: 151).

5 La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C
10 durante 1 minuto, hibridación a 58°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ
15 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación E579D

20 Esta mutación E579D (1800G>C, GAG>GAC, Glu579Asp) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 236 pb correspondiente al exón 12 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator
25 Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex12F (SEQ ID NO: 150) y Ex12R (SEQ ID NO: 151). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio G>C observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la
30 misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 226 y SEQ ID NO: 227.

- 53 -

La mutación E579D se encontró en un varón de 49 años con historia de hipercolesterolemia en la familia (padre con 450 mg/dl de CT, hermano y dos hijos adolescentes con niveles de c-LDL por encima del percentil 95). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 8 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 320 mg/dL, c-LDL 250 mg/dl y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con Atorvastatina (10 mg/día) redujo su cifra de c-LDL a 187 mg/dl.

10 Análisis de la mutación 1815del11

Esta mutación se pudo identificar por análisis de heterodúplex. La electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% del material de PCR amplificado del exón 12 cuando existe mutación muestra la presencia de bandas de heterodúplex de un aparente mayor tamaño molecular que las dos bandas homodúplex de 236 y 225 pb, fácilmente distinguibles en el gel después de la tinción con bromuro de etidio. Las dos bandas de los heterodúplex que se forman migran a velocidad más lenta como consecuencia de la formación de los abultamientos entre las secuencias no apareadas. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186 y SEQ ID NO: 187.

La mutación 1815del11 se encontró en 4 familias no relacionadas con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando de una de ellas, era una mujer de 69 años con arco corneal, evidencia de enfermedad cardiovascular prematura (angor a los 56 años) e historia de hipercolesterolemia en varios miembros de su familia (dos hermanos con CT de 700 y 435 mg/dL respectivamente). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 13 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos bajo tratamiento farmacológico (Simvastatina, 40 mg/día) fueron: CT 444 mg/dL, c-LDL 368 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con Atorvastatina (30 mg/día) redujo su cifra de c-LDL a 225 mg/dL.

EJEMPLO 13: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 13 del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 215 pb del exón 13 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex13F (SEQ ID NO: 27) y Ex13R (SEQ ID NO: 28).

5 La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C
10 durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ
15 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación D630N

20 Esta mutación (1951G>A, GAT>AAT, Asp630Asn) destruye un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción MnlI. Quince microlitros del material amplificado del exón 9 se hidrolizaron con 15 unidades de MnlI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 89pb, 48pb, 39 pb, dos de
25 14 pb y 11 pb para el alelo normal y de 89pb, 59pb, 39pb, dos de 14 pb y 12 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126 y SEQ ID
30 NO: 127.

La mutación D630N se encontró en dos familias no relacionadas con hipercolesterolemia familiar de herencia autosómica dominante. El probando era una

- 55 -

mujer de 36 años cuyos padres habían fallecido ambos de infarto de miocardio a los 62 y 64 años.

El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 7 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 332 mg/dL, c-LDL 268 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL de 81 y 48 mg/dL, respectivamente.

Análisis de la mutación H635N

Como esta mutación (1966C>A, CAC>AAC, His635Asn) no cambia el mapa de restricción, se diseñó y se sintetizó un desoxioligonucleótido con dos bases desapareadas que crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *CaiI* en presencia del alelo normal y que desaparece en presencia del alelo mutado.

Se amplificó un fragmento de 169 pb del exón 13 por la técnica de PCR utilizando el desoxioligonucleótido Ex13F (SEQ ID NO: 27) y el desoxioligonucleótido con dos bases desapareadas MutH635NR (SEQ ID NO: 29).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 56°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de *CaiI* en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 151 y 18 pb para el alelo normal y de 169 pb para el alelo mutado, estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130 y SEQ ID NO: 131.

- 56 -

La mutación H635N se encontró en una familia con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando era un hombre de 43 años con arco corneal y sin historia familiar de enfermedad coronaria prematura. La madre y tres de sus hermanos presentaron concentraciones de colesterol por encima del percentil 95. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 13 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 448 mg/dL, c-LDL 384 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL normales.

10 **EJEMPLO 14: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 14 del r-LDL.**

Se amplificó un fragmento de 288 pb del exón 14 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex14F (SEQ ID NO: 30) y Ex14R (SEQ ID NO: 31).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 20 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación D686Y

La mutación D686Y (2119G>T, GAC>TAC, Asp686Tyr) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 288 pb correspondiente al exón 14 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un

- 57 -

termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex14F (SEQ ID NO: 30) y Ex14R (SEQ ID NO: 31).

5 Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio G>T observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218 y SEQ ID NO: 219.

10 La mutación D686Y se encontró en un varón de 31 años con xantomas tendinosos, arco corneal, evidencia de enfermedad coronaria prematura (angor) e historia de hipercolesterolemia en la familia (padre y varios hermanos con niveles de c-LDL por encima del percentil 95). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 21 puntos. Las concentraciones
15 plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 430 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente combinado con Atorvastatina (40 mg/día) y resina (5 gr/día) redujo su cifra de CT a 205 mg/dl.

20 **EJEMPLO 15: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 15 del gen del r-LDL.**

Se amplificó un fragmento de 243 pb del exón 15 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex15F (SEQ ID NO: 32) y Ex15R (SEQ ID NO: 33).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con
25 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 55°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante
30 90 segundos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón

- 58 -

anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

5

Análisis de la mutación 2184delG

Esta mutación crea un nuevo sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción AluI. Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de AluI en un volumen final de 30 µl, según las instrucciones descritas por el fabricante (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos resultantes tenían un tamaño de 166 y 78 pb para el alelo normal y de 166, 67 y 11 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134 y SEQ ID NO: 135.

La mutación 2184delG se detectó en una familia con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando era una mujer de 32 años con historia familiar de enfermedad coronaria prematura. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 6 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 330 mg/dL, c-LDL 270 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL normales.

Análisis de la mutación T740M

Esta mutación (2282C>T, ACG>ATG, Tyr740Met) introduce un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción NlaIII. Quince microlitros del material amplificado que incluía parte del exón 15 se hidrolizaron con 15 unidades de NlaIII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 247 pb para el alelo normal y de 247, 194 y 53 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación

- 59 -

puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194 y SEQ ID NO: 195.

La mutación T740M se encontró en un mujer de 60 años con arco corneal, historia familiar de hipercolesterolemia y antecedentes de enfermedad cardiovascular prematura en la familia (padre muerto de accidente cerebrovascular a los 34 años). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 10 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 492 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con atorvastatina (10 mg/día) disminuyó su cifra de CT a 251 mg/dL.

EJEMPLO 16: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 16 del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 273 pb del exón 16 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex16F (SEQ ID NO: 152) y Ex16R (SEQ ID NO: 153).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 63°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación V766E

- 60 -

La mutación V766E (2360T>A, GTG>GAG, Val766Glu) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 273 pb correspondiente al exón 16 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un
5 termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex 16F (SEQ ID NO: 152) y EX16R (SEQ ID NO: 153). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio T>A observado se
10 confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238 y SEQ ID NO: 239.

La mutación V766E se encontró en una mujer de 58 años con xantomas
15 tendinosos en codos, xantelasmas, arco corneal, y con historia familiar de hipercolesterolemia. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 12 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 420 mg/dL, c-LDL de 324 mg/dL y con niveles de TG y c-HDL normales.

20

Análisis de la mutación I771T

Como esta mutación (2375T>C, ATT>CACT, Ile771Thr), no cambia el mapa de restricción, se diseñó y sintetizó un desoxioligonucleótido con una base desapareada que crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción HincII en presencia del
25 alelo mutado y que desaparece en presencia del alelo normal.

Se amplificó un fragmento de 142 pb del exón 16 por la técnica de PCR utilizando el desoxioligonucleótido Ex16R (SEQ ID NO: 153) y el desoxioligonucleótido con la base desapareada MutI771TF (SEQ ID NO: 154).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con
30 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron:

- 61 -

10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 61°C durante 1 minuto y elongación a 72 °C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos. Quince microlitros del material amplificado de parte del exón 14 se hidrolizaron con 15 unidades de HincII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 142 pb para el alelo normal y de 121 y 21 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

10 Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 198 y SEQ ID NO: 199.

La mutación I771T se encontró en una mujer de 60 años con evidencia de enfermedad coronaria prematura en la familia e historia familiar de hipercolesterolemia.

15 El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 21 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 422 mg/dL, c-LDL 368 mg/dL y unos niveles de TG y c-HDL normales.

20 Análisis de la mutación 2389+3 A>C

La mutación 2389+3 C>T fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 273 pb correspondiente al exón 16 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System

25 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex16F (SEQ ID NO: 152) y Ex16R (SEQ ID NO: 153). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio C>T observado se confirmó mediante secuenciación

30 automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra.

- 62 -

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254 y SEQ ID NO: 255.

La mutación 2389+3 C>T se encontró en un varón de 36 años con xantomas tendinosos en tendón de aquiles y extensores de la mano e historia de hipercolesterolemia en la familia (madre, hermano y un hijo con niveles de c-LDL por encima del percentil 95). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 18 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 450 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con Atorvastatina (20 mg/día) redujo su cifra de CT a 259 mg/dl.

Análisis de la mutación 2389+4 A>G

Como esta mutación no cambia el mapa de restricción, se diseñó y sintetizó un desoxinucleoótido con una base desapareada que crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BshNI en presencia del alelo mutado y que desaparece en presencia del alelo normal.

Se amplificó un fragmento de 194 pb del exón 16 por la técnica de PCR utilizando el desoxioligonucleótido Ex16F (SEQ ID NO: 152) y el desoxioligonucleótido con la base desapareada Mut2389+4 A>GR (SEQ ID NO: 155).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 61°C durante 1 minuto y elongación a 72 °C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Quince microlitros del material amplificado del exón 16 se hidrolizaron con 15 unidades de BshNI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 194 pb para el alelo normal y de 175 y 19 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al

- 63 -

8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 182 y SEQ ID NO: 183.

- 5 La mutación 2389+4 A>G se encontró en once familias no relacionadas con herencia de la hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando de una de ellas, era una mujer de 22 años con xantomas tendinosos, antecedentes de enfermedad cardiovascular prematura en la familia (padre con hipercolesterolemia e infarto de miocardio a los 29 años). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación
10 según criterios del MedPed de 17 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 356 mg/dL, c-LDL 293 mg/dL con niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante combinado con atorvastatina (40 mg/día) y resina (5 gramos/día) disminuyó su cifra de c-LDL a 227 mg/dL.

15

EJEMPLO 17: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 17 del gen del r-LDL.

- Se amplificó un fragmento de 242 pb del exón 17 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex17F (SEQ ID
20 NO: 34) y Ex17R (SEQ ID NO: 35).

- La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 300 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada desoxioligonucleótido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron:
25 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 58°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante dos minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

- Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón
30 anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL ADN Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia

- 64 -

de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación 2399del5ins4

5 Esta mutación elimina la secuencia TCTTC e inserta la secuencia GGGT en la posición 2399 creando un nuevo sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *Ava*I. Quince microlitros del material amplificado se hidrolizaron con 15 unidades de *Ava*I en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos
10 resultantes tenían un tamaño de 230 y 12 pb para el alelo normal y de 183, 46 y 12 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID
15 NO: 138 y SEQ ID NO: 139.

 La mutación 2399del5ins4 se detectó en tres familias no relacionadas con hipercolesterolemia de herencia autosómica dominante. El probando de una familia era una mujer de 49 años con xantomas tendinosos y cuyo padre había fallecido a los 51 años de infarto de miocardio. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó
20 una puntuación según criterios del MedPed de 16 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos sin tratamiento farmacológico fueron: CT 510 mg/dL, c-LDL 424 mg/dL, siendo sus niveles de TG y c-HDL de 140 y 58 mg/dL respectivamente. El tratamiento farmacológico combinado con simvastatina 20 mg/dL y colestipol 20 g/día redujo su colesterol total plasmático a 280 mg/dL. Por otra parte, dos hijos suyos de 22 y
25 20 años tenían cifras de colesterol de 330 y 386 mg/dL, respectivamente.

Análisis de la mutación 2544insC

 Esta mutación fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 242 pb correspondiente al exón 17 del gen del rLDL al analizar este fragmento en
30 pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se desarrolló en termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman

- 65 -

Coulter, Palo Alto, CA, USA) con los cebadores Ex17F (SEQ ID NO: 34) y Ex17R (SEQ ID NO: 35) la posterior electroforesis en secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. Esta delección se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 246 y SEQ ID NO: 247.

La mutación 2544insC se encontró en un varón de 37 años que había sufrido un infarto de miocardio, xantomas tendinosos, arco corneal, e historia de hipercolesterolemia en la familia (su padre falleció prematuramente de infarto de miocardio). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 21 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 444 mg/dL, c-LDL 379 mg/dL y con niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiente con Atorvastatina (40 mg/día) redujo su cifra de CT a 282 mg/dL.

Descripción de las figuras:

Figura 1: Esta figura es una representación esquemática de la ruta celular que sigue el r-LDL. El r-LDL se sintetiza en el retículo endoplásmico como una proteína precursora de 120 Kilodaltons y es transportado al aparato de Golgi. Una vez que es transferido a la superficie celular el receptor reconoce a la apolipoproteína B que es el componente protéico de las LDL. La unión conduce a la captación, internalización y degradación liposomal por el proceso denominado endocitosis. Esta captación permite satisfacer las necesidades de colesterol de la célula e induce a la supresión de la síntesis endógena de colesterol.

Figura 2: La figura representa los cinco dominios estructurales de la proteína del receptor LDL humana y su correspondencia con los exones del gen.

Figura 3: Portaobjetos de cuantificación de imagen con 4 cebadores (2 normales y 2 mutados) repetidos en 10 pocillos para la mutación E256K. (A) individuo normal (B) individuo con hipercolesterolemia familiar.

- 66 -

REIVINDICACIONES

1.- Secuencia génica correspondiente a SEQ ID NO:1 que comprende al menos una de las siguientes mutaciones: (-23)A>C, 1054del11, 108delC, 1197del9, 1207delT, 1432delG, 191-2delAinsCT, 2184delG, 231delC, 2399del5ins4, 313+1insT, 338del16, 509insC, 675del15, 684dup12, 941-39C>T, C195R, C255G, C319Y, D157G, D630N, E291X, H635N, N59K, T41M, W515X, Y379X, Y421X, T433N, 818del8, 1423delGC/insA, 1204insT, 451del3, G516X, 2389+4A>G, 1815del11, 1186+5G>A, T740M, I771T, R279G, T446I, H562Q, C74Y, D686Y, G(-2)R, E579D, S205C, D200V, V766E, L(-6)P, 2544insC, C42Y, 2389+3A>C, [1587-5del5;1587del31], de aplicación en métodos de diagnóstico extracorpóreos e in vitro, de la hipercolesterolemia familiar.

2.- Secuencia génica según la reivindicación 1 que comprende además, alguna de las siguientes mutaciones: 2393del9, (-42)C>G, (-49)C>T, 1045delC, 1061-8 T>C, A378T, C358R, 1358+1G>A, 1706-10G>A, 1845+1G>C, 2085del19, 211delG, 2140+5G>A, 2207insT, 2390-1G>C, 313+1G>C, 313+1G>A, 518delG, 7delC, 872delC, 884delT, 920ins4, A519T, C113W, C255X, C281Y, C297F, C347Y, C371X, C646Y, C677Y, C68W, C74G, C95R, D151N, D200G, D200Y, D280G, E10X, E246A, E256K, F634L, G322S, G352D, G571E, N543H, N804K, Q12X, Q133X, Q357P, Q427X, Q71E, R395Q, R574W, R612C, S156L, S205P, T413K, T705I, V502M, W(-18)X, W541X, D679E, 1359-1G>A, C127R, 681ins21, C122X, V408M, G528D, D412H, N619N, E80K, L534P, L621S, C356Y, R329X, G248D, C201Y, 313+5G>A, C358Y, C331R, D157N, V776M, P664L, W462X, Q328X, L584P, R395W, G314V, W469X, P678L, R612H, R236W, de aplicación en métodos de diagnóstico extracorpóreos e in vitro, de la hipercolesterolemia familiar.

3.- Secuencia génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 que comprende, además, alguno de los siguientes polimorfismos: 81T>C BstUI Exón 2, 1060+10G>C SmaI Exón 7, 1171G>A StuI Exón 8, 1413G>A DdeI Exón 10, 1617C>T BstNI Exón 11, 1725C>T SSCP Exón 12, 1771C>T HincII Exón 12, 1959 T>C AvaII Exón 13, 2232G>A MspI Exón 15, de aplicación en métodos de diagnóstico extracorpóreos e in vitro, de la hipercolesterolemia familiar.

4.- Uso de la secuencia génica de la reivindicación 1 en el diseño y la preparación de sondas oligonucleotídicas capaces de hibridar con alguna de las siguientes mutaciones: (-23)A>C, 1054del11, 108delC, 1197del9, 1207delT, 1432delG, 191-2delAinsCT,

- 67 -

2184delG, 231delC, 2399del5/ins4, 313+1insT, 338del16, 509insC, 675del15, 684dup12, 941-39 C>T, C195R, C255G, C319Y, D157G, D630N, E291X, H635N, N59K, T41M, W515X, Y379X, Y421X, T433N, 818del8, 1423delGC/insA, 1204insT, 451del3, G516X, 2389+4A>G, 1815del11, 1186+5G>A, T740M, I771T, R279G, T446I, H562Q, C74Y, D686Y, G(-2)R, E579D, S205C, D200V, V766E, L(-6)P, 2544insC, C42Y, 2389+3A>C, [1587-5del5;1587del31].

5.- Sondas oligonucleotídicas capaces de hibridar con cualquiera de las mutaciones comprendidas en la secuencia génica de la reivindicación 1.

6.- Sondas oligonucleotídicas según la reivindicación 5 seleccionadas entre al menos unas de las siguientes SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 29, o al menos una de entre SEQ ID NO: 37 a la SEQ ID NO: 147 o de entre SEQ ID NO: 154 a SEQ ID NO: 259.

7.- Uso de las sondas de la reivindicación 5 en un método extracorpóreo de detección in vitro de mutaciones del gen r-LDL para el diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar.

8.- Uso de las sondas de la reivindicación 6 en un método extracorpóreo de detección in vitro de mutaciones del gen r-LDL para el diagnóstico de hipercolesterolemia familiar.

9.- Dispositivo de ensayo que comprende un soporte al que se acopla alguna de las sondas oligonucleotídicas de la reivindicación 5, de aplicación en la diagnosis de la hipercolesterolemia familiar.

10.- Dispositivo de ensayo que comprende un soporte al que se acopla alguna de las sondas oligonucleotídicas de las reivindicación 6, de aplicación en la diagnosis de la hipercolesterolemia familiar.

11.- Uso de algunas de las sondas seleccionadas entre: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO:

- 68 -

151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153 en un método extracorpóreo de detección in vitro de mutaciones del gen r-LDL para el diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar.

12.- Dispositivo de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10 que comprende un soporte al que se acoplan además alguna de las sondas seleccionadas entre:
5 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID
10 NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153 de aplicación en la diagnosis de la hipercolesterolemia familiar.

13.- Método extracorpóreo de diagnóstico in vitro de hipercolesterolemia familiar caracterizado por detectar en una muestra biológica de un individuo algunas de las
15 mutaciones de SEQ ID NO:1, descritas en la reivindicación 1.

14.- Método extracorpóreo de diagnóstico in vitro de hipercolesterolemia familiar caracterizado por detectar en una muestra biológica de un individuo algunas de las mutaciones de SEQ ID NO:1, descritas en la reivindicación 1, en combinación con alguna de las mutaciones de dicha SEQ ID NO:1, descritas en la reivindicación 2.

20 15.- Método extracorpóreo de diagnóstico in vitro de hipercolesterolemia familiar caracterizado por detectar en una muestra biológica de un individuo algunas de las mutaciones de SEQ ID NO:1, descritas en la reivindicación 1, en combinación con alguno de los polimorfismos de dicha SEQ ID NO:1, descritos en la reivindicación 3.

16.- Método de diagnóstico según las reivindicaciones 13 a 15 que comprende
25 amplificar fragmentos de ADN que contengan las mutaciones de la reivindicación 1, sólo o en combinación con las mutaciones de la reivindicación 2 y/o los polimorfismos de la reivindicación 3, por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando para ello alguno de los desoxiligonucleótidos seleccionados entre SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 259 o combinaciones de los mismos, sometiendo los productos
30 PCR a un análisis por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP), secuenciando aquellos fragmentos que presenten un patrón anómalo por SSCP.

- 69 -

para detectar las mutaciones que serían identificadas con posterioridad mediante análisis de restricción o mediante el dispositivo de ensayo de las reivindicaciones 9, 10 ó 12.

1/3

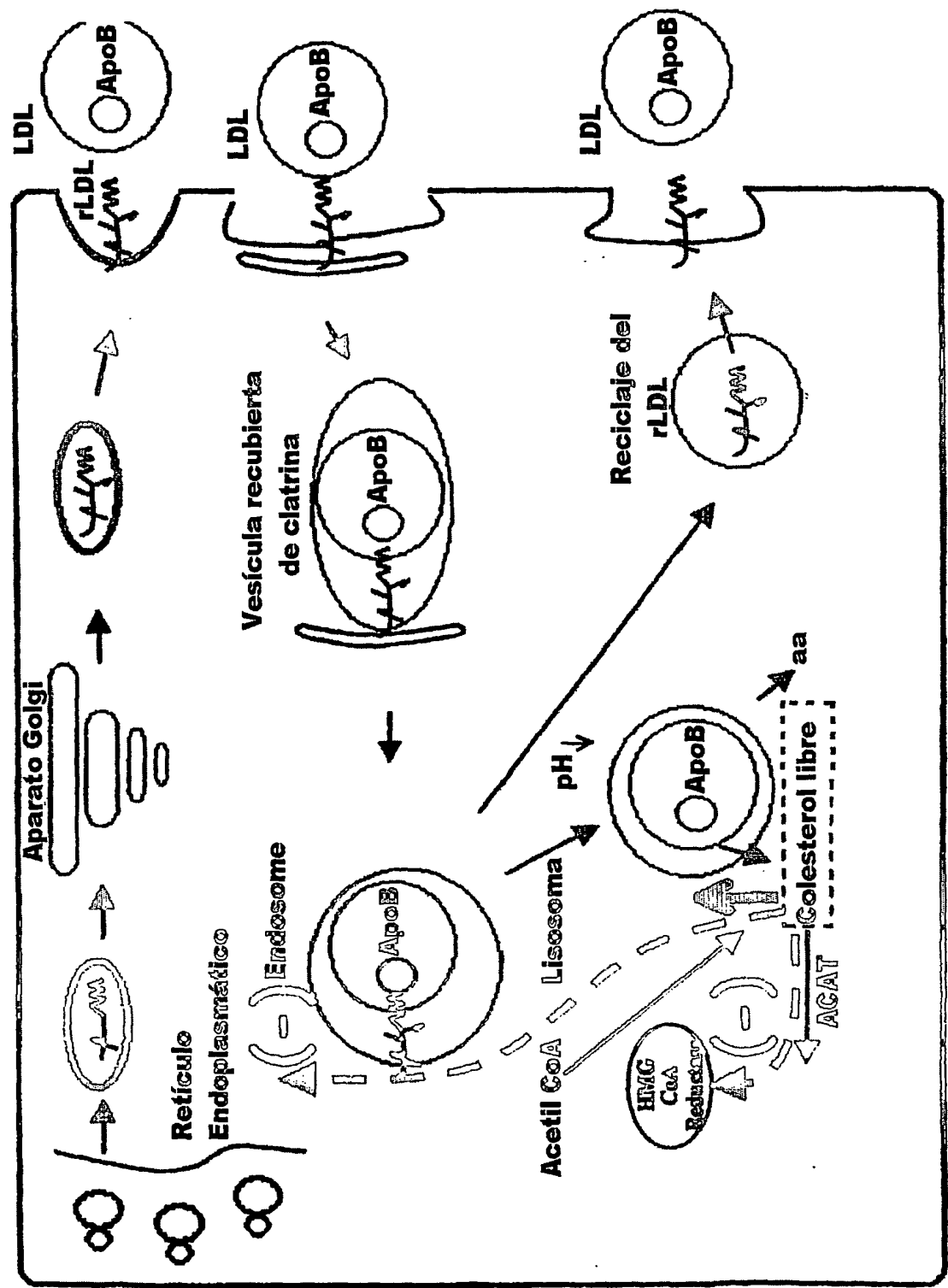


FIG. 1

2/3

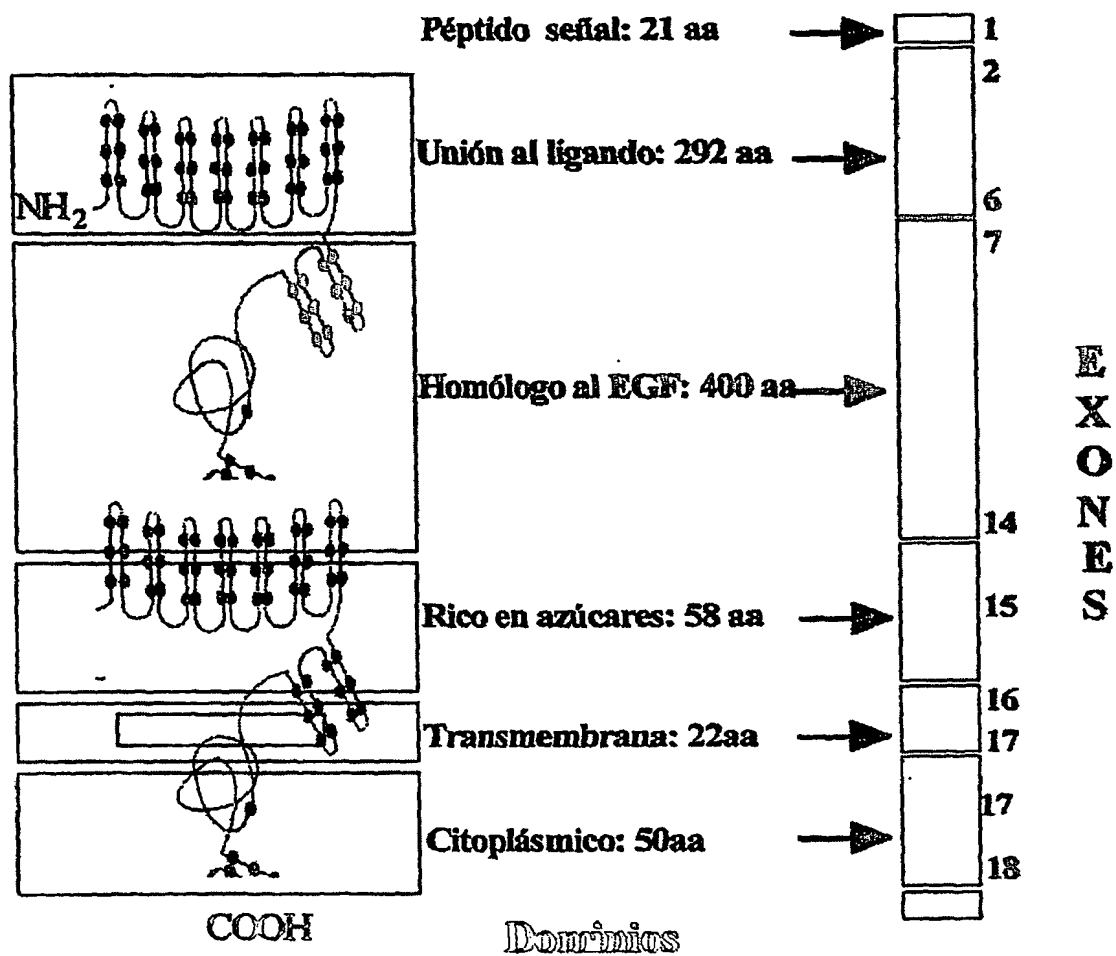


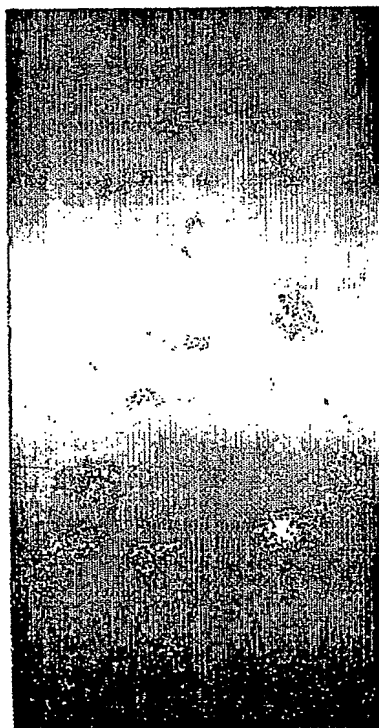
FIG. 2

3/3



B

MUTADO 2
NORMAL 2
MUTADO 1
NORMAL 1



A

FIG. 3

- 1 -

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> EFARMES, S.A.

<120> "PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN SECUENCIAS GENICAS AISLADAS DEL RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL-R) ASOCIADO CON LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR".

<130> PCT-154

<160> 259

<150> ES200300206

<151> 28.01.03

<150> ES200302671

<151> 17.11.03

<210> SEQ ID NO.: 1

<211> 60.000

<212> polinucleótido

<213> humano

<220>

<221> gen

<223> rLDL

<400>

```

aaaagatggt gtatccattc aatggaacat tatttggcct ttaaaaggaa ggaaattctc 60
actgagcata gtggtttatg cctgtaatcc cagcactttg ggaggctgag gcagggggga 120
gggggcggtt cacctgaggt caggagttca agaccagcct ggccaacatg gtgaaatccc 180
gtctctacta aaaatacaaa aaaattagcc gagtgtggtg gcacacacct gtaagccagg 240
ctacacggga gactgaggca ggagaatcgc tggaaaccgg.gaggcagagg ctgcagagag 300
ccgagattgc gtcactgcac tccagcctgg gtgacagagc gagactcttg tcttaaaaaa 360
aaaaagaagg aaggaaggaa ggaaggaagg aagttctgac acaggctcca acacagatgt 420
tatgctcagt gaaataagcc agacatgaaa ggacaaatac tgcctgatct cattcataag 480
aggtccctag aattgtagaa tgggtgtgtg cacgggctgg gagggggtgt ggccagagtt 540
tcagtttggg aagttgagaa tggtctggag atggatggcg gtagtggtgg ttgcacaact 600
gtgtgaatgc gcttaatgcc tctgaattgt gcagttacaa gtggttcgga tgggccgggc 660
gcggtggctc atgcctgtaa tcccagcaact ttgggaggcc gaggcaggtg gatcatgaga 720
tcaggagatc gagaccatcc tggctaacac ggtgaaacct catctctact aaaaaataca 780

```

- 2 -

```

aaaaattagc caggcatggt ggtgggcacc tgtagtccca gctacttggg aggcggaggc 840
aggagaatgg cgtgaacacg ggaggcagaa cttgcagtga gccgagatca cgccactgca 900
ctccagcctg ggcgacagag tgagactccg tctaaaaaaa aaaaagtggg taagatgggc 960
cgggcatggg ggatcacgct tgcaatccca acactttggg aggctgaggt ggggtgattac 1020
gaggtcagga gttcgagacc agcctgacca ccatggtgaa accccgtctc tactaaaagt 1080
acaaaattag ccgggtgtcg tggcacacgt ctgtaatccc agctactggg gaggctgagt 1140
tgggaggatc acctgagccc agggagggtc aggctgcagc aagccatgat tgcaccactg 1200
cactccagcc tgggtgagag agtgagaccc tgtctccaaa caaacacaca tgaaaaacag 1260
atTTTTTTTT ccagggtgag tggctcacac ctgtaatccc agcacttttg gaggccaagg 1320
cgggtggatc acgagggtcag gtgactgaga gcatcctggc taacacgggt aaaccctggc 1380
tctactaaaa atacaaaaat ttagccgagc atggtgggtg gcacctgtag tccagctac 1440
tcgggagggt gaggcaggag aatggcatga acctgggagg cggagcttgc agtgagctga 1500
gatcacgcca ctgcactcta gcctggggga cacagcaaaa ctgtctcaaa aaaaaaaaaa 1560
aaggTTTTTT taatttaaaa aggaaagaaa aggagagtgc tcgtgtggca ggcacctagc 1620
cctgtccagc gcaccctgag acagggtatg tgtctcctcc ttgacctag accacaagtt 1680
ctaaccaatt caaccgagga cagagcccca attccaggca gggcaatggg gtgccttgt 1740
gaactaagat gcagatggag aagagcagac acagacacag gtcttggggc ccctgcaggg 1800
gtttctcact ggctttttcc ccctggattc ctatgggttc tggggaacag agttaggtcg 1860
gctggcaaga cagatgcatg aggtgtgtgg gcccttgaca ttgagccgga gggccagagt 1920
tcgtcattgc tgacgcagag aagctgggag ccaaggtag ccagatggtt tggaggagt 1980
ttaaacaatc ttttcttttc tttctctttc catctgtctg tccttctttc ctcccttct 2040
gccccctttc ttttctcttc tctttctctc ctctctctct cctccctttt tttctttttt 2100
tttggttttc tttttgtatt agtattatta ttttttagac agggctcttg tctgttgccc 2160
aggctggagg gcagtggcac gatcacagct cagtacacc tcaaccttct gggttcaagc 2220
aatcctcctg ccttggcctc ccaggtagct gggactacag gcgtgtgcca ccacacctgg 2280
ttaatttttt ttttttttga gacggagtct tgcctctgtc cccaggctgc agtgacgtgg 2340
cgtgatctcg gctcactgca acctccacct ccggggttca agcgatcctc ctgcctcagc 2400
ctcccagata gctgggatta cacgcgcccg ccaccaagcc cggctaattt ttttattttt 2460
agtagagaca gagtttcacc acgttggcca ggctcgtctc aaactcctga cttagtgatc 2520
taccacactt ggcctctcaa agtgctggga ttagaggcgt gagccaccat gcgcagccaa 2580
tttttgtatt ttttagtagag atggggtttc accatgttgg tcagtctggg ctcgaaactcc 2640
tgacctcaag tgatccacct gcctcagcct cccaaagtgc tgggaattaca ggcattgagcc 2700
accgcgcccc gccctcttaa ccatttttaa gtgcacagtt cagcagcatt aagcacattc 2760
acattgttgt gcaaccatca gccccgtcc atctccagct ttctcttttt ttttgtttgt 2820
tttgagacag ggtcttactc tctcgcccag tatagagtgc agtggtgagg tcttggtctg 2880
ctgcaacctc tgcttccag gttcaagcta ttctcctgcc tcagtctccc cagtagctgg 2940
gattacagac acacatcacc acgcccgtgt aattattttg catttttagt agagatgggtg 3000
tttcaccata ttggccaggc tgatcttgaa ctctggcct caagtgggtc gtcctaaact 3060
gctgagatta cagccgtgag ccactgctcc cagccatctg cacttttctc atcttcccaa 3120
atgtaactat gtccccgtga aacactcact cccatttcca cctccccagc ccctggcacc 3180
ccccatttta ttctggtgct aggggaattt caaaccaggc aagtctcaac acatgctcga 3240
gtgtaagaac cagcccacag cctcgttccc taatcacggg caaaccagaa ttctactcca 3300

```

- 3 -

gggtctactc tgtgaatctg ctttctgtga atctgttact ctggggaccg cctataagtt 3360
 gaatcctaca gtgtctccac ttcagtgact ggcttatttc acttttctcc tctttattta 3420
 tgagacaaaa tttcgtctctt gttgctcagg ctggaatgca atggcgtgat ctcggttaat 3480
 ttttttgtat ttttagtaga ggcgggggtt caccatgttg gccaggcttg tctcgaactc 3540
 ctgacctcag acgatccact ttggccttcc aaagtgcttg gattacaggc gcggcccacc 3600
 tttctcctct taatcacaca ggtaatccat acatacgaca ttcttttttt tttttgacac 3660
 ggagtcttac totgtcacct aggtctggagt gcagtggcgc aatcttggct cactgcaacc 3720
 tctgcctccc aggatcaagc aattctcctg cctcagcctc ctgagtagct gggattacag 3780
 gtaaccatca ccacacctgg ctaaattttg tatttttagt agagacgggg tttcaccacg 3840
 ttggccacgc tggatttgaa ctcttggtt caagtgatct tcctgtctcg gtctcccga 3900
 gtgctgggat tacaggaatg agccactgtg cccggccaat acgacatctg tgcaatgaag 3960
 tgcaacatat aagacaccct tccccaccc actgccccca ccaccgcccc caccgccccca 4020
 ccccatctc cagatcagaa cctgggggctg tgcaatttta aacgtttagt ccacttgcta 4080
 cttgggtagt tgaagttcag tctcagccag gttggagtcc tggactctgg cccctctttt 4140
 atttttattt tttatttttt tttgagacag agtctcgctc tgtcgcccag actggagcgc 4200
 agtggtgca tctcggtca ctgcaagctc tgctcctga gttcacgcca tttccccgcc 4260
 tcagcctccc gagcagctgg gactacaggc gcccgccacc acaccggct aatttcttgt 4320
 atttttagt agagatgggg tttcaccctg ttagccagga tggctagat ttcttgacct 4380
 tatgatccgc ctgcctcggg cctcccaaag tgctgggatg acaggagtga gccaccgccc 4440
 ccggcctctt ttttttttt tagacagtct ctgtcaccca ggctagagtg cgatgggtgcg 4500
 atctcggctc actgcaacct ccacctccg ggttcaagcg attctcctgc ctgacctcc 4560
 tgagtatctg ggattacagg tgcctgtgac caccgcccgc tgatttttgt atttttagta 4620
 gagacgggtt ttcaccacat tggtcaggct agcctcaaac tcctgacccc gtgatccttc 4680
 cgcctcagcc tcccaaagtg ctgggattac aggactctgg cccatcttgg ctgctgcca 4740
 tgtccttctc tctatcttgg tttttccaca gttacgcaca tgccagataa cggcgagtct 4800
 gttccccagc aactgcaacg gatctgcca ccaactggga atggaagacc ttgcagccca 4860
 ggtotttgta gaccaagatt agattgtggt caacaaacac ctgaccttgg cctttggaac 4920
 catcagccat gtcagctaaa ataaaagcag aatctggctg ggcgagtggt ctacgcctg 4980
 taatcccagc actttggggg gctgaggttg gcagaccacc tgaggtccgg cgttctagac 5040
 cagcctgacc aatatgatga aaccccgctc ctactaaaca taaaaaatt agctgggcat 5100
 ggtggcgggc acctgtaac ccagctactc gggaggctga ggaaggagaa ttgcttgaa 5160
 cctggaggca gaggttgag tgagccgaga ttgcgccact gactccaac ctggactgca 5220
 gaacaagact ctgtcccaa agcagataaa taaaaataaa taaaaataaa aatatggccg 5280
 ggcattggtg ctcacacctg taatcccaac actgggaaga tgaggcgggc agatcacgag 5340
 gtcagggtt cgagaccagc ctggccaaca tggtgaaacc ccgtctctac taaaaataca 5400
 aaaattagcc gggcatgatg ctgcatgcct gtaatcccag ctactctgga ggctgaggca 5460
 ggagaatcgc ttcaccccgg gaggtggagc ttgcagttag ctgagatcgc gccactgcac 5520
 tctagcctgg gcaaaagagt gagactccat cgcaagaaaa aaaaaaaaaa aagctgcaag 5580
 ctctgtctcc cgggttcaag tgattctcct gcctcagcct tccaagtagc taggattata 5640
 cgcgcccgc accatgcctg gctaattttt gtatttttag tagagatgcg gtttcaccat 5700
 gttggccagg ctggtctcaa actcctgacc tcacgtgatc cacctgcctc ggccctccag 5760
 agtgctggga ttacaggtgt gaaccctgc gcctggccaa gaaaagttgc ttgaatgaag 5820

- 4 -

agtaaataga agacccagaa agaaatgatt cgtccgagga aggtcacaga agcaacgtaa 5880
 tcaagatgga aatctgactc ttcctaattt tggccagact tcccatccct ccaaagcttt 5940
 ccagactctt ccagatcatt ctagatatatt ccagaaatca ttcgtgaaat ctaactagga 6000
 gtagtctgta aacaatgtgt ttcacacaga tacaattcat aaacgatgag aagacaagga 6060
 cacttcatga atgaaatttt tacggccggg tatgttggct cagcctata atcccaggac 6120
 tttggaagac ccaggcagga ggattgcttg agtccaggag ttcaagacca gtctgggcca 6180
 catagtga cctgtcgt acaaaaaatt taaaaattag gtagatatgg tgggtgatgc 6240
 ctctagtttt agcttttttg gaggctgaag caggaggatc tcttgagccc aggaggttga 6300
 gctgcaatga gctacgattg aactactaca ctccagtctg ggtgacagag aaagaggctg 6360
 cctcaaaaaa ataaaaataa aaaaataagg cgggacgcgg tggctcacgc ctgtaatccc 6420
 agcacttttg gaggtgggg tgggcagacc acgagggtcag gagatcgagg ccatcctggc 6480
 caacatgatg aaaccctgtc tctactgaaa acacaaaaat tagctgggcg tgggtggcgta 6540
 tacctgtaat ccagctact cgggaggctg aggcaggaga atcacttgaa ccagggagtc 6600
 agaggttgca gcgagaggag attgtgccac tgcattccag cctggcaaca gagcaagact 6660
 ccgtctcaa aaagaaacaa caacagcaac aacaacaaaa aaaacataaa aaagttcggg 6720
 cacggtggct cacacctgta atcccagcac tttgggaggc caaggtgggt agatctcttg 6780
 aggtcaggag ttcaagacca gcctggccaa caaacatggg gaaaccccgt ctctactaaa 6840
 aatacaaaaa gtagccgggt gtagtccag ctactcggaa ggctgaggca ggagaatcgc 6900
 ttcaacctgg gagatggaag ttgcagtga ctgagattgc gccactgggt gacagagtaa 6960
 gactcttgct tcaaaaaaaaa aaaaagaaag aaagtttaat ttaatgattc aaataatgac 7020
 ctgctcgaga gataaatata aagtctaacg taagagggtg atactttttc ctctgtcctg 7080
 ctgtcctcgc ccacctcac cccaagtccc aacctgattg atcagtctcc tttccctctg 7140
 gtagccccac tcccatgacc gaaccgagaa gtcatgcacc cgcataagaa ctctaatttt 7200
 ttttttcaaa gtcttctcac tgccccaaaa atagtctctt tcattcccag gggatgtgaa 7260
 agtgtctctc ccaattttat ttcaacctcc cagcgttcca cacatatgcc ttgcctcagc 7320
 cagctttcac tgatctgcca tttccacctc ggcgtgctc ctacctggg aaatcctgtc 7380
 catccatagt ctgattttctg ttgttccaga acattctttt ttttttcccc tggaacattc 7440
 tttaagatac ctcaataaat gaaaccagag ggtatagagc agtatgaatg ggtactacaa 7500
 tgtacagggg gaaatggagg ggaatatgat atactctcct ccttgatatg gcttagaatg 7560
 ttctagaagg atatgcttaa aagggttagca gtcctggcca ggcgtgggtg ctcacgcctg 7620
 taatctcagc actttgggat gccaacgcgg acggatcaca aggtcaggag ttctagatca 7680
 gcctgaccaa tatagtgaat cctcatcttt actaaaaata caaaaattag ccgggtacgg 7740
 tggcatgtgc ctgtagtccc agctactttg gaacctgagg caggagaatc gcttgaactc 7800
 gggaggcaga ggttgcaagt agccgagact gtgccattgc actgcagcct gggtgacaga 7860
 acaggactcc gtctcaaaaa aaaacaaaaa aggtcagcag tcttaattgt cagagggcag 7920
 gggacctgca tgggatggag gtttttccat gtgtccacct tttgagccct tttgcttttt 7980
 ttttttaaat ctttttattg tagcaaaata gatataaat ttaccttttt tttttttgag 8040
 acagggtctc actctgttgc ccagggttga gtgcagtggc atgatcttgg ctactgcag 8100
 cctctgcctc ctgggttcaa gcgattttcc tgccctcagcc tcccagtag ctgggattac 8160
 aggtgcttgc caccataccc ggctaatttt gtatttttag tagagacggg gttacgcaa 8820
 gttggccaag ctggctgcaa actcctgacc tcaagtgatc cgccccctc ggccctccaa 8280
 agtgctggga ttacaggcag gagccaccac gctcagccct aaaatttacc atattaacca 8340

- 5 -

ttttcaagtt cagaggcatt aaagtatact cacattgttg ttcaactgtc accactactc 8400
 acctgcagaa gtttttcatc ttgcaaagtg aaaaccccat acccaatttc ccgttcttcc 8460
 tctcagcccc tggtaatcac tattctactt tttgtctact ttttgtatga atttgcctat 8520
 tctaggacct aatagaagtg gagtcaaacc tgtttgtcct tttgtggctg gcttatttca 8580
 cccggcctta tatectcaag gtttatccat gttggaggat goctgaattt ccttgttttt 8640
 aaggctaaat tttattctat tatattaata tgtcatattt tgtttatcct gatggacact 8700
 tgggttgatt ccacctttgg ccattttgaa gaagcttcta tgtacatggg atacacatat. 8760
 atctttgggt.ctctgctttc aatgcttttg.gggatatttc.agatgtggaa.tttctggatt. 8820
 ataaggcaat.ttttttttt.gagacagact.ctcgctcttg.tcgccaggc tagaatgtgg 8880
 tgggtgtgatc tttttttttt ttttttttga gatggagtct cgctctgtcg cccaggctgg 8940
 agtgcagtgt cacgatctca gctcactgca agctccgct cccagggtcg tgccattctt 9000
 atgcctcagc ctoccaaagta gctgggacca cagccgcccc ccacctcacc cggctaattt 9060
 ttgtattttt agtagagaca gggtttctact atgttggcca ggatggctc gatctcctga 9120
 cctcgtgatc cgctgcctc ggcctccaa agtgctggga ttacaggcgt gagccactgc 9180
 acccggtcg tgtgatcttg gctcgtgca acctctgcct cccagggtca agcgattctt 9240
 gtgcctcagc ctctccgag ctgggactac aggtgtgcgc cactgtgcc agctactttt 9300
 taaaaatata tgtgtattta ttatactttt aagttctggg atacatgtac agaactgtca 9360
 ggtttgttac ataggtatac atgtgccatg gtggtttgct gcacccatca accggtcatc 9420
 tacattaggt atttctccta atgotatccc ttccctagcc ctccactctc ccggtttttt 9480
 gttttgtttt gttttgttgt tttgttttta gtagagacag ggtctacca tgttgcccag 9540
 gctagtcttg aactcctgac ctcaagtgt cgcgccacct cagcctcca aagtgtggg 9600
 attacagggt tgacccacta cactcggcct tattttctact ttttatgca attttcacta 9660
 ttgctatatt ctaggaggca ctgtggaatt gcactgtgga attttagtat tgctgtattt 9720
 cagcaagcca tgaggctctgt cagcacacgg ctttgggcat tttgtgaaga taactgatgc 9780
 cagctgagcc aaggcagggt cctgattcca cccactggca ggcaccgagg tctctgctgt 9840
 tactgatggt ttctctgttg attgatggc ttaaggccag accacagctg caatggctca 9900
 cctctgccaa aggcagggt cggtggggca gagacctatt ccggactgag cctcctggtg 9960
 aattagagag gtagaaaatg ggaggacggg ggcagggtgg ctattacagc gaggaaaatg 10020
 cccaccctga gttgtattag ataactttg gagttcagga actttccaat aaagtgggtt 10080
 ccacagcagg attacttact gactccctaa tagaaagaag gcaggcacag gccgggcgtg 10140
 ttggctcatg tctgtaatcc cagcacgttg ggaggctgag gcggtggat cacaaggta 10200
 ggagatccag accatcctgg ctaacaaagt gaaacccgt ctctactaaa aatacaaaaa 10260
 attaggtgg gcgtggtggc tcgtgcctgt aatcccagca ctttgggagg ctgaggcggg 10320
 cggatcacga ggtcaggaga tcgagaccgt cctggctaac acggtaaaac cccatctcta 10380
 ctaaacatac aaaaaaaaaat tagccagggtg tgggtggcgg cgctgtagt cccagctact 10440
 caggaggctg aggcaggaga gtggtgtgaa ctcgggaggc gcagcttgca gtgagccgag 10500
 actgcgccac tgactccag cctgggcaac agacagagac tccgtctcaa aaaaaaaaaa 10560
 aaaaaataca aaaaattagc caggcgtggt ggcacgtgca cgtgactgta gtcccagcta 10620
 cttgggaggc tgaggcagga gaattgtttg aaccgggag acggagggtg cagtgagccg 10680
 agatcgcgcc actgcactcc agcctgggtg acagagctag actccgtcaa aaaacaaaaa 10740
 acaaaaaaca aaaaaacaaa aaaaaaaaaa cagcaggaac tggcaggctt tccctgaaga 10800
 gataaaaaaa aaaaaatgca gttgcaacac aaaagcagcc acagagaaaa gcaaaccat 10860

- 6 -

atatggtatt tattatgcac cgagtgtggc totaatcact tttttttttt taattgagag 10920
 acagcctggc tctgttgatt gggctggagt gcagtggcgc gaccgtagct cattgcagcc 10980
 tcaacctcct tggctcaagc aatcctccta cctcagcctc ctgagtagct gggaccacag 11040
 gtgtgagcca ccacgcctgg ctaattgttt tttttttttt tgtagagaca gggctctact 11100
 atgtggccca ggctggtttc caactcctgg gctcaagtga tcctcccacc tctgcctccc 11160
 aaagtgctgg ggattacagg catgagccac ctgcctggc ctctagtcgc tttatatatt 11220
 ttaacttaat cottacaaga gccctgtgag ctagttacag gagcacaaat ggaaaccaag 11280
 aaacagaaaa atttatcagc atgactcagt cctcagagcc atgtatggcc gtgtccgtgc 11340
 atggcaggca ggtcaggggc ctggggaacg ctgttctgga aacottggcc aggcttggc 11400
 acccgaggaa tgtgcttttc agagtttttg tggctctttt ccagacctgc cctgacctct 11460
 agctctggga actatgtaag ccaagtgcct tccgggaagg gagtccctct cctggtaact 11520
 ctttctgggt aaccagatgt ggactcatga cacacactga gcctacgtct tataattttt 11580
 tgtttttgtt tttagagacag ttccgtctt cttgcccagg ctggagtgc atggtgcgat 11640
 ctgggtcac tgcaacctct gcctcccagg ttcaagcgat tctcctgcct cagcctccct 11700
 agtagctgga attgcaggca tgcgccacca cgcctggcta attttttgta tttttttttt 11760
 tttagtagaa acgggggttc accttgtag ccaggctgggt caccaactcc tgacctcagg 11820
 tgatccgccc acctctgcct cccaaagtgc tgggattaca ggtgtgagac agctgtgagc 11880
 cacca'cgccc ggcgcatttt ttttttcttt tttttcagag ggagtgtccc tctgtcacc 11940
 aggtgaagt gtagtggcgt gatctcgcc cactgtaacc tctatctccc aggttcaagt 12000
 gattctcctg actcagcctc ccaagtagct gggactacag gcgcctgcta ccatgcctgg 12060
 ctaatttttg tagtttttagt agaaaccggg ttttgccatg ttggccaggc tggctcaaa 12120
 ctcttgactt caggatgatcc acctgccttg gccttctgaa gtgctgggat tatagggcat 12180
 gagccactgt gactggccat cttaaatttt tttttttttt tttttttttt ttgagacagg 12240
 gtttactct gtcgccagg ctggagtgc aaggcgcgat cttgggtcac tgcaagctcc 12300
 gcctcctggg ttcatgccat tctcctgcct ctgcctcatg agtaactgag actacaggcg 12360
 cccaccacca cgcgcggcta atttttttgt attttttttag tagagatggg gtttcacctt 12420
 gttagccagg atggtctcga tctcctgacc tcgtgatcca ccgctctcg cctcccaaaa 12480
 tgctggcatt acaggcgtga gccaccgcac ccagccttaa attttttttt aagggaatc 12540
 aaaccctagt atattgggcc agtacagtgg ctcacacctg taattccacc actttgggag 12600
 gctgaggcag gtgaatcacc tgaggtcagg agttcgagac cagcccggca aacatggcga 12660
 aacccctgt ctactaaaaa taagaaaatt agccgggcgt agtggcatgc acctgtaatc 12720
 tcagctactc gggaagctga ggcatgagaa tcgcttgaa ctgggagcag gacgttgacg 12780
 tgaaccgata tcacaccact gactccagc ctgggtgaca gagcaagact ctgtctcaaa 12840
 aaaaaaaaga aaaaaaatc cagtgatact tactttttta atttttatctt acttattttt 12900
 tgctttaagt tgaatcttta aacttatctt tttttttgag acacagtctc actctgtcgc 12960
 ccaggctgga gtgcagtggg acaaccacag ctcagtgcag cgttgacctc ctgggctcaa 13020
 gccatcctcc cgcctcagcc tcccagtag ctgggactac aggcgcacac aaccatgtcc 13080
 agcttatttt tgtatttttt gtagagacag ggtccactg tgttgccctg gcttgttctg 13140
 aactcctagg ctcaagtgat ccccccgcct caccctcca aagtgtggg attacaggca 13200
 tgagccacca catccagact tcactttttt gtttaatgtc gcaaattggca taaggaatgg 13260
 gattcaatgg ggacacattt ataaacgttg cagcagctcc tagaacttgc ctatccttgt 13320
 aaacttctct aggtgattgc taattacttc tttttttttt tttttttttg agacggagtc 13380

- 7 -

tcactctgtc gccagggctg gagtacagtg ggcgaatctc gtctcactgc aaactccacc 13440
 tcccgggttc acgccattct cctgcctcag cctcccgagt agctgggact acaggcaccc 13500
 gccaccacgc ccggctaatt ttttgatatt ttttttagta gaggtgggggt ttactgtgtg 13560
 tatccaggat ggtcttgatc tctgacctc gtgatccacc tgcctcagcc tcccaaagtg 13620
 ctgggattac aggcgtgagc caccatgccc agcccgctaa ttatttcaat ttgacctga 13680
 cactgagcct gccaaagtagg ttcaagcatt ttgatggccc ctttacaggt tgggaaagct 13740
 aatttatctg tccaaggccg aattctgaaa ctgagcttta actgccaaaa attcttatca 13800
 tcaatttctt cttctgggtt gggcacagtg gctcatgcct gtaaagccag caatttgaga 13860
 ggcacatga tgcaagagga agaggattga gtgaagctag gagtttgga ccagcctggg 13920
 caacatagt agaccccatc tataaaaaaa aattaaaaat tagttgggca tgggtgtgca 13980
 ctctgtggt cctagctatt caggaggctg aggtgggagg attccttgag ccaggggtg 14040
 acgctgcaga gagctgtgat cagccactg cagtcagcc tgagtgcag ctggaaataa 14100
 tgataaataa ataataaata attattttaa aaattataat aaaaataatt aaaaaattat 14160
 ttccctgat taatcttttt tttgtcctt ctgagagttc aatttgtccc tttctgcct 14220
 ggtctcctag gtttccctaa aatcctgctg agaggtagc actgcctgcc aaagtcagtt 14280
 tgcaaaatcc cagagaaatc cagcttattc ctgggggaac cgccaagact gccagccct 14340
 gtgtgggggt caggcaagtt tctcacatgt gccttttttg caagaggcct ctggcaaccc 14400
 catgagtc ccagagact caattctaaa agttgggtct caccagctct ctgtggctta 14460
 ggggttcaag ttcaactgtg aaagccctgt tttgtttga tttgtcttg agggagagga 14520
 aaccgccctt ctgtttgtt aactccttct cctaagggga gaaatcaata ttacgtcca 14580
 gactccaggt atccgtacaa ttgatttttc agatgtttat actcagccaa aggcgggatc 14640
 ccacaaaaca aaaaatattt ttttggtgt acttttgtga agattttatt taaattcctg 14700
 attgatcagt gtctattagg tgatttgga taacaatgta aaaacaatat acaacgaaag 14760
 gaagctaaaa atctatacac aattcctaga aaggaaaagg caaatataga aagtggcgga 14820
 agttcccaac attttttagtg ttttcccttt gaggcagaga ggacaatggc attaggctat 14880
 tggaggatct tgaaaggctg ttgttatcct tctgtggaca acaacagcaa aatgttaaca 14940
 gttaaacatc gagaaatttc agggagatct ttcagaagat gcgtttccaa ttttgagggg 15000
 gcgtcagctc ttcaccggag acccaaatac aacaaatcaa gtcgcctgcc ctggcgacac 15060
 tttcgaagga ctggagtggg aatcagagct tcacgggtta aaaagccgat gtcacatcgg 15120
 ccgttcgaaa ctctcctct tgcagtgagg tgaagacatt tgaaaatcac cccactgcaa 15180
 actcctcccc ctgctagaaa cctcacattg aaatgctgta aatgacgtgg gccccgagtg 15240
 caatcgcggg aagccagggt ttccagctag gacacagcag gtcgtgatcc gggtcgggac 15300
 actgcctggc agaggctgcg agc atg ggg ccc tgg ggc tgg aaa ttg cgc 15350

met gly pro trp gly trp lys leu arg

-21 -20

-15

tgg acc gtc gcc ttg ctc ctc gcc gcg gcg ggg act gca g gtaaggcttg 15400
 trp thr val ala leu leu leu ala ala ala gly thr ala v

-10

-5

-1 1

ctccaggcgc cagaatagggt tgagagggag cccccggggg gcccttgga atttattttt 15460
 ttgggtacaa ataactctc catccctggg agacttggtg ggtaatggca cggggctcct 15520
 cccaaacggc tggagggggg gctggagggg ggcgtgagg ggagcgcgag ggtcgggagg 15580
 agtctgaggg atttaaggga aacggggcac cgctgtcccc caagtctcca cagggtgagg 15640

- 8 -

gaccgcatct tctttgagac ggagtctagc tctgtcgccc aggatggagt gcagtggcac 15700
 gatctcagct cactgcaacc tccgcctccc gggtttaagc gagtctcctc tctcagcctc 15760
 ccgaatagct gggattacag gcgcccaccc accacgcccg cctaattttt gtatttttag 15820
 tagagacggg ttttcacat tttggccagg ctggtctcga accccgacct caggtgatct 15880
 gcccaaaagt gctgggatta caggcgtcag ccaccgcgcc cggccgggac cctctcttct 15940
 aactcggagc tgggtgtggg gacctccagt cctaaaacaa gggatcactc ccacccccgc 16000
 cttaatcct tctgggggag agggcgactg gagaccgga tgtccagcct ggaggtcacc 16060
 gcgggctcag ggtccccgat ccgctttgag cgaccccgag gcgccactgc catcctgagt 16120
 tgggtgcagt cccgggattc cgccgcgtgc tccgggacgg gggccacccc ctcccgcccc 16180
 tgccccgcgc cctttggccc gcccccgaa ttccattggg ttagtccaa caggccaccc 16240
 tcgagccact ccccttgtcc aatgtgaggc ggtggaggcg gaggcgggag tgggaggagc 16300
 ggggcttgtg tacgagcggg gcggggctgg cgcggaagtc tgagcctcac cttgtccggg 16360
 gcgaggcgga tgcaggggag gcctggcgtt cctccgcggt tctgtcaca aaggcgacga 16420
 caagtcccg gtccccggag ccgcctccgc gacatacag agtcgccctc cgttatcctg 16480
 ggccctcctg gcgaagtccc cggtttccgc tgtgtctgtt ggcgacacct ccgtccccac 16540
 cttgtcctgg ggggcgcctt cgccccacca gccccgatca agttcacaga ggggcgcctg 16600
 gccacctca aggcctcggg tctttacgag gttgaaacgt tgcctcagaa tctccccgcc 16660
 cctccttggt ctgcagccga gatcttcagc cacggtgggg cagctatccc ccgggaccga 16720
 cccctgggg tggcctcgct tcttcagagg ctgtgaatgg cttecggttca gctgtccaag 16780
 cggcgatttt tctctgggt gaaatggatt agattttaga ttccacaag aggctgggta 16840
 gtgcatgac ctgagttaga gcttttttag tggcttttaa ttagttgcag agagacagcc 16900
 tcgccctaga caacagctac atggcccttt cctcctgag aaccagccta gcctagaaaa 16960
 ggattgggat tgcctgatga acacaaggat tgcaggaaac ttttttttta attggcaagg 17020
 gggttggctt tgaactggat gagagctttg aactgccttg aaattcacgc tgtaactaac 17080
 acaccagttt cctctgggag gccagagagg gagggagggt gtaatgaaat acggatgatt 17140
 gttcttttat ttttatttac ttatttattt ttttaacttt ttagagatg aggtctcgct 17200
 tgggtgtcga ggctggctt gaactcctgg cctcaagcga tctcctacc tcagcctccc 17260
 aaagtgttg gattacagga gtgagccacc gcgccccacc ggggatgatg atgattgcaa 17320
 acattctgcc actcagtttt acaaaagaaa gagaggcact ggattaatgt gtatctcact 17380
 caccaatcaa cctcttcctt aagagaaaat gtttaaggag tottaggcaa ggccttggtt 17440
 gttcatcact ttagtttctc tctcccgga tggctgagaa tgtgatgtt cctctgttgt 17500
 caaggagact acaccctga tgttttcctc cagacttctg agagctgggtg tgtgtttcta 17560
 gcactttcta gctgcaccac ctcacgctgt agctggcttc aaggcatatc caggggggag 17620
 tttcttgtcc atttccttta caaagggaag ttgttggaat ctgaaccgca agccttcact 17680
 tagacaaaa tcaggcaaca gcggtgagcg cagctccaaa cgtgtcaatg actcaccxaa 17740
 atttgagtaa gggagtggc tgctttaacg agccgcaggg tgattccctt gtcatttccg 17800
 gaaataccta tcttcaggg aacactggga aaaaacaggg agaccttggt tgagacagaa 17860
 aacctgtagg ggaattctgt tctcattcc tgccttctc ttagacttc ctccctgata 17920
 agatccaatt ctagatgggt cgggtgtctc ttgctttgat ggggtgcttg atgggcttta 17980
 ttattattat tattattatt attattattt tgatgggctt tttgatgtcc cttttccttc 18040
 cacactctgt ccaactgtc aagcaaatag cttttgttg ctaagagact gcagatgtaa 18100
 ccgaccagca gcaaacagtg agtcaggctc tctcttccgg aagcaaatc aattgctgag 18160

- 9 -

atcactctgg ggaaaatacc caccttattt ggaaagaagc actgatcaat tgatgtctat 18220
 tttttttttt tttgagttgg agtctcgccc tgtcaccag gctggagtgc aatggcataa 18280
 tctcgctca ctgcaatccc cgctcccg gttccagcaa ttctcctgcc tcagcctcct 18340
 gagtagctgg aattataggg ccctgccaca acaccggct aatttttgta tttgtagtag 18400
 agatgggggt tcaccacgtt ggccaggetg gtctcgaact cctgacctcg tgatccaccc 18460
 gcctcagcct cccaaagtcc aaggattgca ggcgtgaccc actgtgccag ccaatcaatt 18520
 gatttctcat tcattttcag ctggctctgt tcccttaagc caggggattt tcgtttgttt 18580
 gtttcccctt caaggaaatg attctagcta cagttttgat ttcttgtac aactgttttc 18640
 agtagcacag ggaaagaaaa catcgaaagc attcaccacc tcatttgtgt gctgggggaa 18700
 aaagcagaaa tgtgtattct ctttttttgt ttcatgacc ttgttctga cttgttactc 18760
 gtgacttgag agatcagagg gctagaggac tagaatttat agaggtgttt tttttgtttg 18820
 tttatttttg ttcatgttgc ccaggctgga gtgcagtggc gcaatctcgg ctcaactgaa 18880
 cctctgcctc ccaggttcaa gcgattcttc ggctcagcc tctgagtag ctggaactac 18940
 aggcgcccgc caccacaccc agctaatttt tgtatttttc agtagagatg ggatttcacc 19000
 atattggtca agctggcctc gaactcctga cctcgtgac caccgcctc agtttcccaa 19060
 agtgctggga gtacaggcgt gagccgcctt gccggcctt tttgtgtttt tgtgtttttg 19120
 agaggagctc attgcttttt aggcctccct agcgtgagaa aatctgggga tccatgctct 19180
 agtttacttc cttttttttt ttttttttga gatggagtct cgcttagatt gcctaacttc 19240
 agctcattgc aacttctgcc tccgggggtc aagggtattc cgtgtctcag cctcctgggt 19300
 agctaggata cgggcacccg ctaccatgcc tggctaattt tgtactttta gtagagacag 19360
 ggtttcgcca cgttggccag gctgggtctc aactcctgac ctgaggtgag ccgcctgcct 19420
 tggcctccca aagtgtgag attacaggcg tgagccaccg cgcttggcct aatttgcttt 19480
 tctgaaatt caaatggtct aatatgaaa acgccaacct tgcttgaaag aataagaaag 19540
 aggtgcgggt tcgttggggt gttgatgttt ggaacaggac tggttttgtc cccttgctcg 19600
 gaaagggcag caactgtgag gacagctccc tgacgtgctc tcaactagca ctgttccgtt 19660
 cctgagcact gtcccacta gctaggccaa gggagctcat ttggcaggca actgctgtct 19720
 ggctgcgcct gtggcagtaa aatctgcctt ttttttttgg aggcagggtc ttgcctgtc 19780
 gctcaggctg aagtgtgcag ttatagctca ctgcagcctc cagcttctgt actcaactga 18940
 tcctcctctc tcagcctcct gagtagctgg gactatacgc acgtgttacc actcccacct 19900
 cagtttgttt gtttatttat ttatttattt atttattgag atggagtttt gctcttgcgt 19960
 cccaggctgg agtgcaatgg cgcgatctcg gctcaccgca acctccacct cctgggtcaa 20020
 gcgattctcc tgcctcagcc tctgagtag ctgggattac aggcattgcac caccacgccc 20080
 ggctaatttt gtatttttcg tagagatggg gtttctccac attgggttcag gctgttctcg 20140
 aactcccaac ctgagtgat caccgcct cagcctcca aagtgtggtg attataggcg 20190
 tgagcccccg aaccggcca ctcccagcta agtttaaat tttgtttgt ttgttcgttt 20260
 gtttttattt tttgagacag agtctccgc ccaggctgga gcgcagatca ctgcatcctt 20320
 gacctccag gcttaagcca tcctcccac tcagcctccc aagtagctgg gattacagg 20380
 gtgtgccact atgcttggct aagttgtgta tttttgtag agatgggggt caagggttgc 20440
 tcgctttgtt gcctcggtt gtctcaaaact cctgggtcag agcagtcctc cctcctcagc 20500
 ctcccaagg gctggggaaa tccacttttg aaacattgtc tggagagttg cccagggtgt 20560
 agatcacaga aataggctcat cgtgggtcc ttcccatggg tgcagtcttg agccacctgt 20620
 ggccagcaaa tatttggaga ataatagtca ggggagagct tgaggtccag ggaaagggtt 20680

- 10 -

tgtttttctt cagggaaagg tttttattgt tctttatccc tccttaaagg accttcaggt 20740
 gttactgaca ttcccggtct acccagtggc acatttagtt tgtaagctgg gccctcgtac 20800
 agaggtaggg aggtgagagc attggattag tggtcaccaa agctgcggtc acctagtggg 20860
 gtgatcagag gctcctccct taagatcttg attgccaacg cctctggccc aactttcctt 20920
 tttatttatc gcaagcctcc tggaatctca attgcttttt gcccacccgg tgtgtcagca 20980
 caagaaatga gtcatttcct cctttaagca cagttgaaat tgagctgtga gtcagtggag 21040
 tgtgtacgat attgtcaaag cgggggtgtg acagtattga cagatctgta gttgggcaag 21100
 agaattatca gagtttgtga ccacagcaga ttccaaagct cgactcattt tcttctctct 21160
 tccttccctt tttctttttc tttttttttt tttttttgac agagtctcgc tctgttgccc 21220
 aggctggagt gcagtggcac aatctgggct cactgcagcc cctgcctcct gggttcaaatt 21280
 gattctcatg tttcagcctc ccgagtagct gcaattacag gcattcgggt tcaagtgatt 21340
 ctctgcctc agccacctga gcagtggga ttacaggcgc ccgccaccac gcccggttaa 21400
 tttttgtatt tttagtagag acggggtttc accatgttgg ccaggctggg ctcgaaactcc 21460
 tgaactcagg tgatccgccc acttcggcct cccaaagtgc tgagattaca gacgtgagtc 21520
 accgcgcccc gcctgttctg ttctttaatt ctcaaaacac cctctaggaa gtagagactg 21580
 ccattctccc ccattttaca gatcaggaaa ctgagtccca gaaggattta gtcagttacc 21640
 caagttgttc tagttaaatg gcctggaaag ccagtgaagc ccaggattgt ctatctaacc 21700
 cccttactac tctaactttc agggaaatcca catgaatgtg ctgggtcaac catcaaagtt 21760
 gaaatggata aagggggctg gatgcgggtg ctgatgcctg taatcctagc actttgggag 21820
 gccgagatgg gtgggtggat tgcttgagcc caagagttag agaccagcct gggcaacata 21880
 gtgagacacc tgtctctgca aaaaataaat aaaaagttag ctgagtgtga tgggtcaccc 21940
 ctctagtcac agctgttgag ttaggcttag gcaggaggat cgcatagaacc tgggaggtgg 22000
 aggcggccgt gagcctcagt catgccactg cactccaacc tgggcaacag agtgaaagcc 22060
 ggtgtccgaa agagaaagaa aaaaagacat agatacatct tttaaagtta ggttgtatgt 22120
 taattaccta caactcagtt tcaactgtgc ttaaaggagg aaatgactca tttcttgcta 22180
 catatcaaat tagcccaaaa tgtagtggct taaaacaaca catttatgat ttctcagttt 22240
 ttgctgtgca ggaatttgga agcagcacag ctgacgggtt ccagctcagg gtctctcatg 22300
 aagttgcaat caaaatattg gcaggagaga aaaacatatt ttcagaagct gcaggcatag 22360
 gaagacttggt ctgggggttg aggatccact tccaagatgg cgcaactcagt ggccttggtc 22420
 tggaggcctc agttccctgc tgcgtggagc tctccctcca gctgcttgag tggactcatg 22480
 acatgcagct ggcctccctt ggagcagtcg atccaacaat gagcatggcc atgaactagg 22540
 ctcagaagcc actccctgtc gtctctacat tttcctatca gaagcaagtc attaaaagtc 22600
 cagtgccact ccaggggaga cgaattaggc tctgccttct gaaaggatta tcacagaaga 22660
 tgcggtccta tattcttttt ttaaaattat tctttttttt attttgtaga gatgggtctt 22700
 tggtagtggg cctaggccag tctggaattc ctgggctcaa acaatcctgt ctctgcctcc 22780
 caaagtgttg ggattacagg catgagccac tgcacctggg catgtggtca tattttcttt 22840
 ttcttttttt tttttttttg agacagagtc tctgtcggcc aggcctggagt atgggtggct 22900
 gatctcagtt cactgcagcc tccgcctccc gggttcaagc gattctcctg cctcagcctc 22960
 ctgagtagct gggattacag gcgcccgcga acatgccag ctaatttttt tagtagagat 23020
 ggggtttcac catgttagcc aggatgggtc cgatctcctg atttggtgat ccgcccacct 23080
 tggcctccca aagtttcaac catcgatcag aacttattga tgtacttatg tagctaggca 23140
 cgggtggcgcg tgcctgtaat ccagctact tggaagggtt aaggcaggag aatcgcttga 23200

- 11 -

acctgggagg cagagggttac agtgagtcaa gatcatacca ttgcactcca gtctgggcaa 23260
 cagaatgaga ctctgtctca aaaacaaaaa acaaacccctt gtatgtgatt ttcttgata 23320
 gcatctgtta catcttcaca aagataaaaa gtcagacttg gctgggcatg gtggctcaca 23380
 cctgtaatcc cagcactgag aggctgaggc aggagatca cttgagggtca ggaatttgag 23440
 accaggctgg gcagcatggt gaaaccccggt ctctacaaaa aatacaaaaa ttagccgggt 23500
 gtgggtgtcac gcacctgtat tcccaagcta ctcaggaagc taaggcagga gaatcacttg 23560
 aaccagagg tggaggtttg cagtgaattg agattgtgcc attgcactcc agcctyggcg 23620
 acagagtgag actctgtgtc aaaaataaaa taaaataaaa ttttaaaaaa ggcagatttt 23680
 tttttcttct tggattgtt accttattat agtaataata agtgcatagt gcatgctgag 23740
 ataagcaatc ataatttggt attgcggccg ggcattggtg ctccagccta taatcccagc 23800
 actttggtca ggagttcaag gccagcctgg ccaatatagt gaaactccat ctctactaaa 23860
 atacaagaaa ttacctgggc atggtggcag ttgctggtga tccccagcta cttgggaggc 23920
 tgaggcagga gaatcgcttg aacctgggaa gcagagggtg cagtgaacca agattgcacc 23980
 actgcactcc agcctgggtg acagagtgag actctgtctg aaaataataa taataataat 24040
 ttgttattgc ttttattgcc ttagtttaca tagggaatca aagtttatac tttgatttat 24100
 aaaagttgct ttgattctag ttacagaaac cagaatcttt catataaagg tattagaggg 24160
 cccagtgtgg tggctcatgc ctgtaatccc agcatattgg gaggctgagg agggaggatc 24220
 actttaggag tttgaggcca gcctaggcaa catagtgaga ccttgtctct acaaaaaatt 24280
 ccaacattag ctgggcatgg tggcatgtgc ctgtagtccc atttatttg ggggctgagg 24340
 caggaggatc acttgagccc acgaggttca atccagggtg cagtaagcca tgatcctgcc 24400
 actgcactcc agtttggtga acagagcgaa gctatgtctc aaaaaaagaa aaaaaagta 24460
 ttctaaatcc aaatttaata tataaaacta aatgcaggcc aagtgtggtg gcatatacct 24520
 ataatcacia cactttggga ggctgagggt ggaggattgc ttgagcccaa gagttcaaga 24580
 ccagcctagg taacacagta agaccccatc tctacaaaaa gtagaaaaat tagccaggca 24640
 tgggtgtgag tgcttttaaat cccaactact tagggggctg agatgggaag attgcttgag 24700
 cctcagagtt tgaggctgca gtgggccgtg atcgctccac tgatcgctct aaagtgaagc 24760
 cctgtctcaa aaaaaaagaa aatagaagaa aactaaatac attcaataag actttgatct 24820
 cttttccaag gtgtaaatat attttgggaa attttccagt tactttgttc tcattttaat 24880
 gtaataatct aagtcttggt tttctaagga aaagttttct ottattatat cttttgttaa 24940
 tgtttctctc ccatttcttt tgatctgac ttcagataca tgattatctt cactgctaaa 25000
 tttgtgttct ctggcctcta catttataat ttctcataat tttttatcta agtatttctt 25060
 ccctacctac tgaagaaaac tcaagttttc ttccacctta atgattatgc tgtgtctgtg 25120
 agttttcttc atgactcttt acagtacaag ttttttgttt ttgttttttt aatggtcaga 25180
 tggatagaac aacacagggt ttgtttgttt tgttttaact tttaaaaaaa ttataataga 25240
 taaagggtct cactacgttg tccaggctga tctcactc ctgggctcaa gcaatccacc 25300
 cacctctgcc tcccaaagtg ctgggattac agtcatgagc caacatgcct gggcagtaca 25360
 gggttttttt gagacggagt tttgttcttg ttgccagggc tggagtgcga tggcacaatc 25420
 ttggctcacc acaaagtctg cctcccagggt tcaagtgatt ctctgcctc agcctcctga 25480
 gtagctggga ttacaggcat gtgccaccac gccagctaa ttttgtattt ttagtagaga 25540
 cggggtttca ccatgttggc caggctggtt tcgaactgct gacctcagggt gatctgcca 25600
 cctcggcctc ccaaagtgtt gggattacag gcatgagcca ccatgccag ctgtagtaca 25660
 ggttttaata tgctaaatac tcttccttc tttattaatg tgcatggaag ttctaataat 25720

- 12 -

```

tttttcccat accccagaga gtccatattt tggaatcaac aacactagcc tttgttgaca 25780
agtgtctctc ttgggttcct tctttgtgtc ctccactgaa ttttgggggt cataaaattt 25840
catttgttgt gcttgcttaa ttccctggga atcagactgt tctgatcgg atgacatttc 25900
tggttaattc tttagttggc aggaaataga cacaggaaac gtggtcagtt tctgattctg 25960
gcgttgagag accctttctc cttttcctct ctctcag  tg ggc gac aga tgc gaa 26014
                                al gly asp arg cys glu
                                5
aga aac gag ttc cag tgc caa gac ggg aaa tgc atc tcc tac aag tgg 26062
arg asn glu phe gln cys gln asp gly lys cys ile ser tyr lys trp
      10              15              20
gtc tgc gat ggc agc gct gag tgc cag gat ggc tct gat gag tcc cag 26110
val cys asp gly ser ala glu cys gln asp gly ser asp glu ser gln
      25              30              35
gag acg tgc t  gtgagtcctt tttgggcatg atatgcattt atttttgtaa 26160
glu thr cys l
40
tagagacagg gtctcgccat gttggccagg ctggtottga atttctggtc tcaagtgate 26220
cgctggcctc ggcctcccaa agtgtctgga ttacaggcac cacgcctggc ctgtgacacg 26280
attcttaacc cttttttgat gatggcggct ggaaaagtgg ccagtggatt ttgatgtatt 26340
caatcatgaa ttaggaggtg gggagagaat gaattattgg agctttcctt aaagccatta 26400
aatggctcta ttgttttttc aattgatgtg aatttcacat aacatgaaat taaccagctc 26460
agtggcatta atacatctgc aatgctgtgt ggccaccacc tctatcttgt tccaaaactt 26520
tgcataacct aatgtctttt tttttttttt tttttgagac ggagtctcgt tccatcacc 26580
aggctggagt gcagtgggtg gatctcagct cactgcaacc tccgcctccc aggttcacgc 26640
cctcctcctg cctcagcctc ccgagtagct gggactacag gcaccctcca ccacatccgg 26700
ctaatttttt gtatcttttag tagagatggg gtttcacat gttagccggg atgggtctcga 26760
tctcctgacc tcgtgatcca cctgcctcgg cctcccaaag tgctggcatt acaggcgtga 26820
gccaccatgc ccggcctatt ttttttttta agagatggag tctaattctg ttgccaggc 26880
tggagtccag tggtaaccat atacttcaact gcagccttga cctcttgggc tcaagtgatt 26940
ctcttgccct gaactcccaa agtattggga ttacagggtg gagccaccgc actcagccta 27000
atgtccagtt tttaacaagc tccattttaa tgccctcgt tttgacccat aaaggggtag 27060
gcttggccgg gcacaatggc ttgtgtctgt agtccagct acttgggagg ctgaggcaga 27120
aaggcagaaa gattgcttta taaagcccag gagtttgagg gccacctggg tggcatagct 27180
agacctcatc tctaaaaaat aagtaataaa taaatatttg tttttgtttt tttctttttc 27240
ttttcttttt tttttttttt tgagacggag tcttgctctg ttgccaggc tggagtgcag 27300
tggcgcgatc tcagctcact gcaagctgtg cctcctgggt tcatgccatt ctctgcctc 27360
agcctcccga gtagctggga ctacaggcgc ccaactaccac gccagctaa ttttttgtat 27420
tttttagtaga gatgggggtt caccacgtta gccaggatgg tctcaatctc ctgacctcgt 27480
gatccgccag ctttggcctc ccaaagtgtt gggattacag gcgtgagcca ctgagccgc 27540
cccatatgta tgtatatata ttttttttta aaatgggaga ccaggcatgg tggctcatgc 27600
ctagaatccc agcacttttg gaagctgagg taggcggatc acttgaggcc atgagtttga 27660
gaccagcctg ctcaacatga tgaaacttct atctctacta aaaaaaaaaa tgggattagg 27720

```

- 13 -

tcaggcacgg tggctcacac ctgtaatccc agcactttca gaggccgagg caggaggatc 27780
 atgaggtcag gagatcgaga ccatacctggc taacacgggtg aaaccccgtc tctactaaaa 27840
 aaatacaaaa aattagccag gcgtgggtggc ggggtgcctgt agtcccagct actcaggagg 27900
 ctgaggcagg agaatggcgt gaacccggga ggccggagctt gcagtgagcc aagatcgtgc 27960
 cactgtactc cagcctgggc gacagagcaa gactctgtct caaaaaaaaaa aaaaaaagtg 28020
 ggattgacat tctcttcaaa gttctgggggt tttcctttgc aaagacagga ttggcaaggc 28080
 cagtgggtct tttttgtgtg tgtgtgtgtg acggagtctc actctgccac ccaggctgga 28140
 gtgcaatggc aggatctcgg ctcaccgcaa cctcctcctc ccagggttaa gtgattctcc 28200
 tgcctcagcc tcccagtag ctgggactac aggtgcccgc caccacaccc aactaatttt 28210
 tgtattttta gtagagacag ggtttcacta tattggccag gctggctctg aaccctgac 28320
 ctcacgtgat ccaccgcct tggcctccca aagtgtctggg attacaggcg tgagccactg 28380
 tgctcggcct cagtgggtct ttcctttgag tgacagttca atcctgtctc ttctgtag tg 28440
 eu
 tot gtc acc tgc aaa tcc ggg gac ttc agc tgt ggg ggc cgt gtc aac 28488
 ser val thr cys lys ser gly asp phe ser cys gly gly arg val asn
 45 50 55
 cgc tgc att cct cag ttc tgg agg tgc gat ggc caa gtg gac tgc gac 28536
 arg cys ile pro gln phe trp arg cys asp gly gln val asp cys asp
 60 65 70 75
 aac ggc tca gac gag caa ggc tgt c gtaagtgtgg ccctgccttt 28581
 asn gly ser asp glu gln gly cys p
 80
 gctattgagc ctatctgagt cctggggagt ggtctgactt tgtctctacg gggtcctgct 28641
 cgagctgcaa ggcagctgcc ccgaactggg ctccatctct tgggggctca taccaagcct 28701
 ctcccgccct tcaaatcccc ccttgaccag gaggcattac aaagtgggga tgggtgctacc 28761
 tcttcggggt tgtcacgcac agtcaggag gctgtccctg ccgagggcta gccacctggc 28821
 acacacactg gcaagccgct gtgattcccg ctggctcgtga tccccgtgat cctgtgatcc 28881
 ccgccccgtg aggctgaaca catagtgacg cttgctagcc aagcctcaat gaccacgta 28941
 acatgaaggg ggaagccca gaaagtctg ccaaggagca aggccaagaa tcccgaaggg 29001
 aaatggactt tgaagctggg cgtcttcttg gctgtcttaa tacaagtggc acatccaaat 29061
 ccaaaacccc gaaattcaaa gtcttgagca ccgaaattc tgaaacgtct tgagcactga 29121
 cctttagaag gaaatgctta ttggagcatt ttggatttcg gatttttacc actgagtgtg 29181
 gagtccaat taggaaaaaa accaggctga ccgaacaaaa ggaaagcaat aaaagaaggc 29241
 agatagggtc aggcacgggt gctcaccct gtaatcccag ccttttgaga ggctgaggcg 29301
 ggtggatcac ttgaggtcag gatttcgaga gcagcctggc caacacgggt aaaccccatc 29361
 tctactgaaa atacaaaaac tagccaggta tgggtggcgtc tgctgtaat ccagctact 29421
 cgggaggctg agacaggaga atcacttgaa cctgggaggc agaggttgca gtgagccaat 29481
 atcacgcat tgactccag cctgggggac aagagcgaat ttctgtctca aaaaaaaga 29541
 agaagaaggc cgacaaacta tgtaactctg cttttctcca tgggtccagaa cacacagccc 29601
 tctgcgtaa ataactcctt atcttctgc tcccagctat catcagacac ctgggctgat 29661
 agaaaattgc aagttagctc actgcaacct cggcattata agtactgcac aaagccctct 29721
 tcagcgaca gcacaagcac cattctataa aatctccagc aagcggccag gtgcagtggc 29781

- 14 -

tcataacctgt aatcccagca ttttgggaga ctgaggcggg cggatcacct gaggtcagga 29841
 gtttgagacc agcctggcca acatggtgaa acccgtctc tattaaaaat acaaaaaaat 29901
 tagccaggcg tgggtggcagg tgctgtaat ccagctact tggaaggctg aggcaggaga 29961
 atcgcttgaa cccgggaggt ggaagttgca gtgagccgag atcttgccat cgcactccag 30021
 cctgggggac aagagtgaga cttcgtctca aaaaaaaaaa aaaaaattcc cagcaagcct 30081
 ttgtcttctg gcagtcagct cctctcttgc tgacctgctc attgctttct tgcaagggtat 30141
 tttcctacct actttctgga ataaatctgt ctttctgtac ttacaactac cttttttaaa 30201
 atttctttct tttttgagat ggagtctcac tctgtttgcc caggctggag ttcagtgggtg 30261
 caatctcagc tcaactgcaac ctctacctac tgggttcaag cgattctcct gcctcagctt 30321
 cccgagtagc tgggattaca ggcgtgcacc agcacgcagg ctaatttttg tatttttagt 30381
 agagacgggg tttcaccatg ttggccaagg tggctttgaa ctcttgacct caagtgatcc 30441
 tcccacctca gcctcccaa gcgctaggat tacggccatg agccactgag gccggctgca 30501
 cctacaactg tcttgataaa ttcttacctc cacacctg gtccagatag tcagtgtcga 30561
 cccacaacat taaggatatt ccaaatttga aacattccaa aatcagaaaa atattccaac 30621
 tctgaaaata ttccaaaatc caaaaaaatt caaaatccaa aacacttctg gtcccaagca 30681
 ttttagagaa gggatactca acccaaaata aggacagcaa ttctataaat tgtgtacca 30741
 tcttgaggt ctcagtttaa cagctttaca cctattagcg caccagtgtc catagcagtg 30801
 ctgggaaatg tgtacagatg aggaaactga ggcaccgaga gggcagtggt tcagagtcca 30861
 tggccctga ctgctcccca gccgccttt ccaggggcct ggctcactg cggcagcgctc 30921
 cccggctata gaatgggctg gtgttgggag acttcacacg gtgatgggtg tctcggccca 30981
 tccatccctg cag cc ccc aag acg tgc tcc cag gac gag ttt cgc tgc 31029
 ro pro lys thr cys ser gln asp glu phe arg cys
 85 90 95
 cac gat ggg aag tgc atc tct cgg cag ttc gtc tgt gac tca gac cgg 31077
 his asp gly lys cys ile ser arg gln phe val cys asp ser asp arg
 100 105 110
 gac tgc ttg gac ggc tca gac gag gcc tcc tgc ccg gtg ctc acc tgt 31125
 asp cys leu asp gly ser asp glu ala ser cys pro val leu thr cys
 115 120 125
 ggt ccc gcc agc ttc cag tgc aac agc tcc acc tgc atc ccc cag ctg 31173
 gly pro ala ser phe gln cys asn ser ser thr cys ile pro gln leu
 130 135 140
 tgg gcc tgc gac aac gac ccc gac tgc gaa gat ggc tcg gat gag tgg 31221
 trp ala cys asp asn asp pro asp cys glu asp gly ser asp glu trp
 145 150 155
 ccg cag cgc tgt agg ggt ctt tac gtg ttc caa ggg gac agt agc ccc 31269
 pro gln arg cys arg gly leu tyr val phe gln gly asp ser ser pro
 160 165 170 175
 tgc tcg gcc ttc gag ttc cac tgc cta agt ggc gag tgc atc cac tcc 31317
 cys ser ala phe glu phe his cys leu ser gly glu cys ile his ser
 180 185 190

- 15 -

agc tgg cgc tgt gat ggt ggc ccc gac tgc aag gac aaa tct gac gag 31365
 ser trp arg cys asp gly gly pro asp cys lys asp lys ser asp glu
 195 200 205
 gaa aac tgc g gtatgggagg ggccaggggtg ggggaggggc gtcctatcac 31415
 glu asn cys a
 210
 ctgtccctgg gctccccag gtgtgggaca tgcagtgatt taggtgccga agtggatttc 31475
 caacaacatg ccaagaaagt attcccattt catgtttgtt tttttttttt cttttctttc 31535
 tttattttgt ttttgagatg gagtctcact ctgtgatttt tttcatctct aaatttccta 31595
 catccatatg gccaccatga ggccccaggc tggccgatgg ttgctgtag cttattggga 31655
 aatcactgtt tggaagggtgc tgggtgtttt ttgttgtttg ttgtttttgt ttttgttttt 31715
 gttttgagac ggagtctcgc tctgtcgcca ggggtggagtg cagtggcgcg atcagctcac 31775
 tgcaacctcc gcttcctggg ttcaagccat tctcctgcct cagcctccca agtagcgcg 31835
 attacaggca tgtgccacca cctccggcta tttttttttt tatttagtag agatgggggt 31895
 tcaccatgtt agtcaggctg gtcataaact cttgacctca ggtgatccac ccgcctcggc 31955
 ctcccaaagt gctgggatta caggcgtgca ctgctgcacc cagccttttt ttgttttttt 32015
 gagacagggt cttgctgtca cccagggtga agtaagggtg cacgattatg gctcactgcy 32075
 gccttgatct ccttggtcga agcgatcctc tcacttcagc ctctcaagca gttggaacca 32135
 caggctgtac caccaagcct ggccaatttt tttgtacaga cacaggctgg tcttgaactc 32195
 ctgggctcaa gcaatcctcc tgccttgccc tcccaaagtg ctgggattcc aggcattgagc 32255
 cgctgcaccc ggcaaaaggc cctgcttctt tttctctggt tgtctcttct tgagaaaatc 32315
 aacacactct gtctgtttt ccag ct gtg gcc acc tgt cgc cct gac gaa 32365
 la val ala thr cys arg pro asp glu
 215
 ttc cag tgc tct gat gga aac tgc atc cat ggc agc cgg cag tgt gac 32413
 phe gln cys ser asp gly asn cys ile his gly ser arg gln cys asp
 220 225 230 235
 cgg gaa tat gac tgc aag gac atg agc gat gaa gtt ggc tgc gtt aat 32461
 arg glu tyr asp cys lys asp met ser asp glu val gly cys val asn
 240 245 250
 g gtgagcgctg gccatctggt tttccatccc ccattctctg tgccttgctg 32512
 v
 cttgcaaagt atttgtgaag ccagagggcg cttccctggt cagctctgca ccagctgtgc 32572
 gtctgtgggc aagtgacttg acttctcaga gcctcacttc cttttgtttt gagacggagt 32632
 ctgctctga caccaggct ggagtgtgtt ggcacaatca cagctcacgg cagcctctgc 32692
 ctctgatgtc cagtgttct cctgcctcag cctcccgagt agctgagatt aaaggcgtat 32752
 accaccacgc ccggctaatt tttgtattt ttattagaga cagggtttct ccatgttggc 32812
 caggctggtc ttgaactcct ggtctcagggt gatccacccg cctcggcctc ccaaagtgtc 32872
 aggattacag gtgtgagcca ctgcgccagg cctaattttt ttgtattttt agtagagatg 32932
 cggttttgcc atattgcca ggctggtctc gaactcctgg gctcaagcga tctgcctgcc 32992
 ttggcctccc aaagtgtgtg gattacaggc acaaacacc gtgcccagcg cgttttctta 33052
 atgaatccat ttgcatgcgt tcttatgtga ataaactatt atatgaatga gtgccaagca 33112

- 16 -

aactgaggct cagacacacc tgaccttcct ccttcctctc tctggctctc acag tg aca 33271
al thr
ctc tgc gag gga ccc aac aag ttc aag tgt cac agc ggc gaa tgc atc 33219
leu cys glu gly pro asn lys phe lys cys his ser gly glu cys ile
255 260 265
acc ctg gac aaa gtc tgc aac atg gct aga gac tgc cgg gac tgg tca 33267
thr leu asp lys val cys asn met ala arg asp cys arg asp trp ser
270 275 280 285
gat gaa ccc atc aaa gag tgc g gtgagtctcg gtgcaggcgg cttgcagagt 33319
asp glu pro ile lys glu cys g
290
ttgtgggggag ccaggaaagg gactgagaca tgagtgtgtt agggtttttg gaactccact 33379
ctgcccaccc tgtgcaaagg gctccttttt tcatthttgag acagtctcgc acggctcgccc 33439
aggctggagc gcaatggcgc gatcttggct caccacaacc tccggctccc aggttcaagc 33499
gattcttctg cctcagcctc ctgagtagct gggattacag ctgaatgcca ccttgctggg 33559
ctaatttttg tatttttagt agagatgggg ttccaccatg ttggccaggc tggcctcgaa 33619
ctcctgacct cgagtgatct gccgcctcc tgaagtgtct ggattacagg cgtgagccac 33679
ctcgtccttg tgagggtttt tttttttccc caaccctctg tgggtggatac tgaagacca 33739
tattaggata actgtacagt atagagaagg cagtggcaag ttttctctgt catataccag 33799
agtgggcttg ggcattggtg catactcctg tagtctcagc taatcaggag gctgaggaag 33859
gaggatcgct tgggcccagg agttggagac tgtagtgagc tgtgatcaca ccaccacact 33919
tcaatctggg caacagagca agagacccta tctctaaaaa aaagtaagta tttcggacac 33979
tgtggggccat acggctctctg gtgcagtttc tcaacatggc tgttgggtga acacaaccac 34039
gcacagaacg caaaccaata cacgtggctg tgggcccaga aaatgttatt tatggacaca 34099
aaaattggaa tttcatataa ctgttttggt tcatgaaaat gatttccctt tttattttta 34159
tttttcttct caagtattta aatatgtaa agccattttt aggcctggca ggatggttca 34219
cagctgtaat cccagcactt tgggaggtcg aggcgggagg atcacgaggc caggagatcg 34279
agaccatcct ggccaacaca gtgaaacccc gtctctacta aaaatacaaa aaattaacca 34339
ggcttgggtg cgcgcgtctg tagtcccagc tgctcaggag gctgaggcag gagaatcgct 34399
tgaatgcagg aggcggaggc tgtagtgagc cgagggttgc cactgcact ccagcctgag 34459
cgacagagtg agagtccgcc tcaaacaaaa aaatgtttgc ccatgctggt cttgaactcc 34519
tgggctcaag ctatctgcct gccttgggtt cccaaagttc tgggattaca ggcattgagct 34579
acagcgcccg gacttttggt gttttatata tatatatcta tatataactt gttttatgta 34639
tatataaac ttgttttata tatatacata aactgcagta aaaaacatgt aacataaaat 34699
ttacctctc aaaccttatt aagtgcacag ttctgtgcca ttagcaaatt cacactgttg 34759
tacaacatca caaccacat ctccagaact tttttttttt tttttattct ttttgagaca 34819
gagtctcact cgtcgacagg gctggagtgc agtgggtgca tctcggttca ctgcaacctc 34879
cacctaccag gttcaagcaa ttctcctgcc tcagccccct cagtagctgg gattacaggc 34939
gcccgtccta ccacgcccag ctaatttttg tattttcagt agagactgac tgggtttcac 34999
catgttggcc aggcgtggtc cgaactcctg acctcaagtg atcctccac ctcagcctcc 35059
caaagtgtg ggaatacagg catgagccac tgcgcccggc ccagaactc ttttatcttc 35119
ccaaactgaa gctctgtccc catgaaacac tcaactctcca tccctcccc aactcctggc 35179

- 17 -

```

accaccatt ctactttctg tccctatgaa tgtgatggct ctagggacct cctctgagtg 35239
gaatcagaca gcattttcct tttttgactg gcttatttca ctgagccaag tgcggtggca 35299
cacgcctgta atccccaaac tttgggagac cgaggcgggc gcatcaccag aggacaggag 35359
nncgagacca gcccggccaa cagggggaaa ccccatcact agggagcctg cagaaagaaa 35419
gccaccacat ggocctgctg agccacacaa tcccagcaaa acagggacgc taaacgtagg 35479
agaaacacac aaccccagga ggcggaggtc gcagttagcc gagatcgtgc cattacactc 35539
cagcctgggc aacaagagtg aaactccgtc tctcctaaaa atacaaaaaa attagctggg 35599
catggtggca catgcctgta gtcccagcta cttgggaggc tgaggcagga gaatcacttg 35659
aaccggggag gtggaggttg taatgagcca aggttgccg cgaagggatg ggtaggggcc 35719
cgagagtgac cagtctgcat cccctggccc tgcgcag gg acc aac gaa tgc ttg 35773
                                ly thr asn glu cys leu
                                295
gac aac aac ggc ggc tgt tcc cac gtc tgc aat gac ctt aag atc ggc 35821
asp asn asn gly gly cys ser his val cys asn asp leu lys ile gly
    300                                305                                310
tac gag tgc ctg tgc ccc gac ggc ttc cag ctg gtg gcc cag cga aga 35869
tyr glu cys leu cys pro asp gly phe gln leu val ala gln arg arg
    315                                320                                325                                330
tgc gaa g gtgatttccg ggtgggactg agccctgggc cccctctgcg cttcctgaca 35926
cys glu a
tggcaaccaa acccctcatg cctcagtttc cccatctgtt aagtgtgctt gaaagcagtt 35986
aggaggggtt catgagattc cacctgcatg gaaaactatc attggctggc cagagtttct 36046
tgcctctggg gattagtaat taagaaattt caggccgggt gcgtaatccc tgtaatccca 36106
acaccttggg acgccgaggc gggcagatca cctgaggtcg ggagttccag accagcctga 36166
ccaacatgga gaaaccccg tctactaaa aatacaaaat tagccgggct tgggtgtgca 36226
tgcctataat cccagctact caggaggctg aggcaggaga atcacttgaa cctgggaggt 36286
ggaggttgtg gtgagccaag atcgtgccat tgcactccag cctgggcaac aagagtgaaa 36346
ctccatccaa aaaaaaaaga aaagaaaaga aaaaaagaa aagaaatttc agctgacaca 36406
gcttcacact cttggttggg ttcccgtggt gaatgatgag gtcaggtgat gactggggat 36466
gacacctgga tgtttccttg attacatctc ccgagaggct gggctgtctc ctggctgcct 36526
tcgaaggtgt gggttttggc ctgggcccc tgcctccgtc tctagccatt ggggaagagc 36586
ctccccacca agcctctttc tctctcttcc ag at atc gat gag tgt cag gat 36638
                                sp ile asp glu cys gln asp
                                335
ccc gac acc tgc agc cag ctc tgc gtg aac ctg gag ggt ggc tac aag 36686
pro asp thr cys ser gln leu cys val asn leu glu gly gly tyr lys
    340                                345                                350                                355
tgc cag tgt gag gaa ggc ttc cag ctg gac ccc cac acg aag gcc tgc 36734
cys gln cys glu glu gly phe gln leu asp pro his thr lys ala cys
    360                                365                                370

```

- 18 -

aag gct gtg g gtgagcacgg gaaggcggcg ggtggggggcg gcctcacccc 36784
lys ala val g
375
ttgcaggcag cagtgggtggg ggagtttcat cctctgaact ttgcacagac tcatatcccc 36844
tgaccgggag gctgtttgct cctgagggct ctggcagggg agtctgccgc cctgttagga 36904
cttgggcttg ccagggggat gcctgcatat gtcctagttt ttgggaatat ccagttaacg 36964
gaaccctcag ccctactggt ggaacaggaa ccggctttcc tttcaggggac aacctgggga 37024
gtgacttcaa ggggttaaag aaaaaaatt agctgggcat ggtgccacac acctgtgggc 37084
ccagctactc agaaggctga ggcgggagga ttgcttgagg gcaggaggat tggttgatcc 37144
tcccacctca gcctccggag tagctgggac ctgaggtgca tgccactatg cctgggctaata 37204
tttttttttt cttttttttt ttttttcgag acggagtctc gctctgttgc ccaggctgga 37264
gtgcagtggc aggatctcgg ctcaactgaa gctccgcctc ccgggttcac gccattctcc 37324
tgccctcagcc tccccagtag ctgggactac aggagccgc cactgcacca ggccaatttt 37384
tttgtatttt tagtagagac ggggtttcac tgtgttagcc aggatgggtc cgatctcctg 37444
acttcgtgat ccgccacct cggccttcca aagtgtcggg attacaggcg tgagccactg 37504
cgcccagccg ctaattttca ttttttagt aaaaacaggg tttcaccatg ttggccaggc 37564
tagtcttgaa ctctgaacc caagtgatcc tctgccttg gcctcccaa gtgctgggat 37624
tacagacacc acacctggct attattattt tttagagaca ggggtgctgct ctatcttcca 37684
gcctgtagtg cagtgcagcc tccatcatag ctgctgcag ccttgacctc ctgggttcac 37744
gtgatcgtcc cgcctaagcc tctggaggag ctgggagtac tggcatgtgc caccatgcct 37804
ggttaatttt tttttttttt tttttgagac agagtctcat tctgtcacc aggctggagt 37864
gcggtgggtg gatcttggct tactgaaacc tccacctccc aggttccagc aattctcctg 37924
cctcacct ctgagtagct gggattacag gttccggcta ccaaacctgg ctagtttttg 37984
tatgttttagt agagacaggg tttcaccatg ttgggtgaggc tgggtctogat tctcccgct 38044
cagcctccca aagtgtggg attacaggct tgagccaccg tgccctggctt tttttttttt 38104
tttttttttt gtggcaataa ggtctcattg tcttgcccag gctagcctta tgctcctagc 38164
ctcaagtgat cctcctccct cagcctccca aagtgtggg attacagggtg ggccgactg 38224
tgccgttcc cgttgggagg tcttttccac cctctttttc tgggtgcctc ctctggctca 38284
gccgcacct gcaggatgac acaaggggat ggggaggcac tcttggttcc atcgacgggt 38344
cccctctgac cccctgacct cgtcccccgg acccccag gc tcc atc gcc tac ctc 38399
ly ser ile ala tyr leu
375 380
ttc ttc acc aac cgg cac gag gtc agg aag atg acg ctg gac cgg agc 38447
phe phe thr asn arg his glu val arg lys met thr leu asp arg ser
385 390 395
gag tac acc agc ctc atc ccc aac ctg agg aac gtg gtc gct ctg gac 38495
glu tyr thr ser leu ile pro asn leu arg asn val val ala leu asp
400 405 410
acg gag gtg gcc agc aat aga atc tac tgg tct gac ctg tcc cag aga 38543
thr glu val ala ser asn arg ile tyr trp ser asp leu ser gln arg
415 420 425

- 19 -

atg atc tgc ag gtgagcgtcg cccctgcctg cagccttggc ccgcaggtga 38594
 met ile cys se
 430
 gatgagggct cctggcgctg atgcccttct ctctctctgc ctgag c acc cag ctt 38649
 r thr gln leu
 435
 gac aga gcc cac ggc gtc tct tcc tat gac acc gtc atc agc aga gac 38697
 asp arg ala his gly val ser ser tyr asp thr val ile ser arg asp
 440 445 450
 atc cag gcc ccc gac ggg ctg gct gtg gac tgg atc cac agc aac atc 38745
 ile gln ala pro asp gly leu ala val asp trp ile his ser asn ile
 455 460 465
 tac tgg acc gac tct gtc ctg ggc act gtc tct gtt gcg gat acc aag 38793
 tyr trp thr asp ser val leu gly thr val ser val ala asp thr lys
 470 475 480
 ggc gtg aag agg aaa acg tta ttc agg gag aac ggc tcc aag cca agg 38841
 gly val lys arg lys thr leu phe arg glu asn gly ser lys pro arg
 485 490 495
 gcc atc gtg gtg gat cct gtt cat gg gtgcgtatcc acgacgctga 38887
 ala ile val val asp pro val his gl
 500 505
 gggctgcaga gggaatggag ggagcaggaa ggagcttcag gaactgggta gtgggctggg 38947
 catggtggct caaagcacct gtaatccag cactttggga ggccaagggtg ggtggatcat 39007
 caagaccagc ctgaccaaca tggtgaaacc tcgtctctac taaaaatata aaaattagcc 39067
 ggggtgtgggtg gtgggcacct gtaatccag ctgctcggga ggctgaggca ggagaatcac 39127
 ttgaacctgg gagatggagg ttgcagttag ccaagacagc cccactgcac tccagcctgg 39187
 gtgacagagt gagactccgt ctcaaaaaaa aaaaaaaaaa ctaaacaaaa aactgggttag 39247
 tggctagaca acaggatggg atcttccaag cccatggctg actcagcagc tcctgggtca 39307
 agacactgtg acctgtgtcc cctggcagga agcatcgccc ctgccacctg cccgggtgtac 39367
 tctgtacctg tcaggtgaca tctgctacct aagcacgtga gaggtggcat ttcacagttt 39427
 cagtgtgggtg ctgacaaccc gggacgcaca ctgtccttgc agctacaatc aggaggtgaa 39487
 tgttgggttt ccagcagaga aactggaga aggcacactt ggtgtctgga agggaaaagc 39547
 aggggaagaga gcatcatcag atgcctgcgg gtgaagggtg gcccgtatg gccagcgctc 39607
 ctttttattt ttatttattt atttatttga gatggaatct cgctctgtcg cccagactgt 39667
 agtgcagtgg tgcgatcacg gctcactgca agctccgct cacaggttca cgccattctc 39727
 ctgcctcagc ctcccgagta gctgggacta caggcacccg ccaccacgcc cggttaattt 39787
 tttgcatttt tattagagac ggggtttcac cgcgttagcc aggatgggtc aaatctcctg 39847
 accctgtgat ccaccgcct cggcctccct aagtgccttg attacaagcg tgagccacca 39907
 cgcccgccc cttttttatt ttttattttt tgagacggag tctcgctctg tcgcccaggc 39967
 tagattgcag tggcgtgac tcggtcact gcagcctccg cctcccaggt tcaagtgatt 40027
 ctctgcctc aacctcccaa ctaattagga ttacaagcat gtaccacat gcctgactaa 40087
 tttttgtat ttttagtaga gactgggttt caccatgttg gctaggctgg tctcgaaccc 40147

- 20 -

ttagcctcaa gtaatctgcc tgcctcagcc tcccaaacag cggggattac aggcattgagc 40207
 cactgtgccc aacccaaccc tggatctctt ttaaacaaga caatgctcgc tgttgccaca 40267
 gaacaatggg tggggtacat gtggcccagt gtgtttggcc acataactgc caggccagag 40327
 ggaaagagac tctcagactg tctccactca gatacaaatg tgtgtgttgt gtgcgttgt 40387
 tctggtctca tttttgtttg ttttgagaca ggggtgtcgt ctgtcactga gtctggagt 40447
 cagtggcgca atcagagttc actgcagcct caaactcttg ggctcagttg attctccac 40507
 ttcagcctcc caagtagctg gaactacagg tgaacaccac tgtgccagc taatttattt 40567
 tatttttagt agagatgagg tctcactatg ttgccaggc tggctctgac ctctagcct 40627
 caagcaatcc tctgccttg gtctcccaaa gtgctgggat tacacgtgcg agccattgcg 40687
 catggcttgt gttcttgtgt ttcttctttt ttctttcgag atggcgtctc agtctgccac 40747
 ccaggctgga gtgcagtggg gtgatcatag ctactgtag cctcaacttc ctgggtctca 40807
 gcaatcctct tgatttcagc ctcccgggcc tggccagcat ggtgaaacc cgtctctact 40867
 aaaaatacaa aaatgtagcc aggcgtgggt gtgggcgcct gtaatcccag ctacaccaga 40927
 ggctgaggca ggagaatcgc ttgagcctgg aagggtgagg ttgcagcaag ccaagatcgt 40987
 gccactgcac tccagcctgg gcaacagaga cagactctgt ctcaaaaaaa aaaaaaaaaa 41047
 acccaaacaa gccacatttg gagtttgggg ttcccagcag gactatttcc caagcctgag 41107
 cctggctgtt tcttccagaa ttcgttgcac gcattggctg ggatcctccc ccgcctcca 41167
 gcctcacage tattctctgt cctcccacca g c ttc atg tac tgg act gac tgg 41220
 y phe met tyr trp thr asp trp
 510 515
 gga act ccc gcc aag atc aag aaa ggg ggc ctg aat ggt gtg gac atc 41268
 gly thr pro ala lys ile lys lys gly gly leu asn gly val asp ile
 520 525 530
 tac tcg ctg gtg act gaa aac att cag tgg ccc aat ggc atc acc cta 41316
 tyr ser leu val thr glu asn ile gln trp pro asn gly ile thr leu
 535 540 545
 g gtatgttcgc aggacagccg tcccagccag ggccgggcac aggcgtggagg 41367
 a
 acagacgggg gttgccaggt ggctctggga caagcccaag ctgctccctg aaggtttccc 41427
 tctttctttt ctttgtttt tctttttttg agatgaggtc ttggtctgtc acccaggctg 41487
 gagtgcactg gcgcaatcgt agctcactgc agcctccacc tcccaggctc aagtgatcct 41547
 cctgcctcac cctcctgagt agctgagatt acagacacgt gccaccacgg cagactaatt 41607
 ttattttatt tttgggaaga gacaaagtct tggtatgttg gcctggctgg tctcaaactc 41667
 aggggtgcaag cgatcctccc gcctcagcct tccaaactgc tgggattaca ggcgtgggcc 41727
 accgtacca gctccttga agtttttctg acctgcaact cccctacctg cccattggag 41787
 agggcgtcac aggggagggg ttcaggctca catgtggttg gagctgcctc tccagggtgct 41847
 tttctgctag gtccctggca ggggtcttc ctgcccggag cagcgtggcc aggcctcag 41907
 gaccctctgg gactggcatc agcacgtgac ctctccttat ccacttgtgt gtctag 41963
 at ctc ctc agt ggc cgc ctc tac tgg gtt gac tcc aaa ctt cac tcc 42010
 sp leu leu ser gly arg leu tyr trp val asp ser lys leu his ser
 550 555 560

- 21 -

atc tca agc atc gat gtc aac ggg ggc aac cgg aag acc atc ttg gag 42058
 ile ser ser ile asp val asn gly gly asn arg lys thr ile leu glu
 565 570 575
 gat gaa aag agg ctg gcc cac ccc ttc tcc ttg gcc gtc ttt gag 42103
 asp glu lys arg leu ala his pro phe ser leu ala val phe glu
 580 585 590
 gtgtggctta cgtacgagat gcaagcactt aggtggcgga tagacacaga ctatagatca 42163
 ctcaagccaa gatgaacgca gaaaactggt tgtgactagg aggaggtcctt agacctgagt 42223
 tatttctatt ttcttctttc tttttttttt tttttttgag acagagtttt gctctcggtt 42283
 cccaggctgg agggcaatgg catgatctcg gctcacgca acctccacct cccaggttca 42343
 agtgattctc ctgtctcagg ctccccagta gctgggatta caggcatgca ccaccacat 42403
 gcccggttaa ttttgtattt ttagtagaga cggagtttct ccatgttggt caggctggtc 42463
 tcgaactccc gacctcaggt gatctgcctg cctcggcctc ccaaagtgtt gggattacag 42523
 acttgagcca ccgcgccag ctatttctgt tttctttctt tcttcttctt cttttttttt 42583
 ttctaagaga caggatctca ctctgtcccc aggcaggagt gcagtgtgtt gatcatagct 42643
 cactgcagcc ttaacctcct gggctcaagt gatcttccca cctcagcctc ccaagtagct 42703
 ggaactacag gtgcacacca ccatgcccag ctcatTTTTTg tttttttttt ttttttgaga 42763
 cagtctcggt ctgtcacccc ggctggagtg cagtggtaga atcttggtc actgcaacct 42823
 ctgcctccca ggttcaagcg attctcctgc ctcagcctcc tgagttagttg agattacagg 42883
 catgtgtgcc atcatacctg gctgattttt gtattttttt ttagagatgg ggtctcagta 42943
 tggtgaccag gcttgtctta aactcccggc ctcaagtgat cctccactt cagtctccca 43003
 aagtgtggg attacaggca tgagccactg cggccggtt gttttctttt ttttttcggt 43063
 ttttgagac ggaatttcac ctttggtgcc caggatggag tgcaatggca cgatatcgcc 43123
 tcaccacaac ctctgcctcc tgggttcaaa ccattttcct gcctcagcct tcttagtagc 43183
 tgggattaca agcatgtgcc accacgccc gctgattttt tttttttagt agagatgggg 43243
 tttctccatg ttggccaggc tgggtctgaa ctctgacct caggtcattc gccacctct 43303
 gcctcccaa gtgctgggat tacaggcgtg agccaccgtg cccggtggtt tgtattcttt 43363
 ttactgagag tcgtgaaagg cagtgatcct ctgtcacatg tgatcttggc tctcagggga 43423
 catttgcaa tttctagaga ttttttggtt gtcacaagtc aatggggaag actgttggca 43483
 tttagtgggt agaggtggt gacgtgctg aacaccaga acagggaagt agcaggccct 43543
 agatagagcc atcgtgggga aacctgctc taaggaaatg gcgctatttt ataaccacac 43603
 gttcctggca tgattacaa cagccaaaag tggagtcccc ccaagtgtgt tcgtccattt 43663
 gcattgcagt aaaggaatag ctgaggccgg gtaatttata aagaaaagag atttaaactg 43723
 ggtatggcag ttatgccta taatcccaga actttgggag gctgaggcag gaggatcgct 43783
 tgagtccagg agtgtgagac cgagaccagc ctggccaaca tgacgaaact ctgtctctac 43843
 aaaaaataca aaaagtaggc caggcacggt ggttcacgcc tgtaatccca gcactttggg 43903
 aggccgagge gggcggtatca cgaggtcagg agatcgagac catcctggct aacacggtga 43963
 aaccccgctc ctactaaaaa tacaaaaaca aaattagccg ggtgtggtgg caggcgctg 44023
 tagtccagc tactcgggag gctgaggcgg gagaatggcg tgaacccggg aggcggagct 44083
 tgcaagtgag caagatcgcg cactgcact ccagcctggg tgaccgagtt gagactccgt 44143
 ctcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaataca aaaagtagcc aggtgtggtg gcaggcacct 44203
 gtaatcctgg gttctcgaga ccgaggcatg agaattgcct gacccagga ggtggaggct 44263

- 22 -

gcagtgagcc aagatcatgc cactgcactc cagcctgggc gacagagtgg gactctgtct 44323
caaaaaacaa caaaaaaaaaa gttcttgaaa tggatgggtg tgatgggtgat acttccacaa 44383
cagcgtgaat ctgcttaagg ccaccgaact gtgcactcac aaatagtcga gatggtacat 44443
tttatgttat gtgtatttca ccacaattaa aaactagtgtg tgggccaggt gtgggtggtc 44503
atgcctgtaa tcccagcact ttgggagggtc agaggggaggt ggatcatgag gtcagcagtt 44563
cgagaccagc caggccaaca tgggtgaaacc ccactctctac taaaaatata aaaattagcc 44623
aggcgtgggtg gcacatgcct gtagtcccgag ctacttgaga ggctgaagca ggagaatcgc 44683
ttgaacctgg gaggctaaga ttgcagtgag ccgagatcgt gccactgcac tccagcctgg 44743
acgacagagt gagacttcgt ctcaaaaaaa aaacaaaaaa aaaaattagc tgtgggtcag 44803
gcactgtggc tcacgcctgt aatcccagca ctttgggaga ccgaggtagg tggatggcct 44863
gaggtcagga gttcgaatcc agcctggcca acatggtgaa agcccgctctc tactaaaaat 44923
acaaaaaatt agtcaggtat gttggcacac ctgtaatccc agctactcgg gaggtgaag 44983
caagagaatc gtttgaaccc aggaggtgga cgttgcagtg agccgagatt gggccactgt 45043
actccagcct gggcaacaaa agtgaaactc tgtctgaaac aaacaaacaa acaaacaac 45103
agacaaacaa aaaaactagt tgtggagaga ggggtggcctg tgtctcatcc cagtgtttaa 45163
cgggatttgt catcttcctt gctgcctgtt tag gac aaa gta ttt tgg aca gat 45217
asp lys val phe trp thr asp
595 600
atc atc aac gaa gcc att ttc agt gcc aac cgc ctc aca ggt tcc gat 45265
ile ile asn glu ala ile phe ser ala asn arg leu thr gly ser asp
605 610 615
gtc aac ttg ttg gct gaa aac cta ctg tcc cca gag gat atg gtt ctc 45313
val asn leu leu ala glu asn leu leu ser pro glu asp met val leu
620 625 630
ttc cac aac ctc acc cag cca aga g gtaaggggtg gtcagcccca 45358
phe his asn leu thr gln pro arg g
635 640
ccccccaac cttgaaacct ccttgtggaa actctggaat gttctggaaa tttctggaat 45418
cttctgggtat agctgatgat ctcggtcctg ccctgactcc gcttcttctg ccccag 45474
ga gtg aac tgg tgt gag agg acc acc ctg agc aat ggc ggc tgc cag 45521
ly val asn trp cys glu arg thr thr leu ser asn gly gly cys gln
645 650 655
tat ctg tgc ctc cct gcc ccg cag atc aac ccc cac tcg ccc aag ttt 45569
tyr leu cys leu pro ala pro gln ile asn pro his ser pro lys phe
660 665 670
acc tgc gcc tgc ccg gac ggc atg ctg ctg gcc agg gac atg agg agc 45617
thr cys ala cys pro asp gly met leu leu ala arg asp met arg ser
675 680 685
tgc ctc aca g gtgtggcaca cgccttggtt ctgcgtcctg tgtcctccaa 45667
cys leu thr g
690
ctgccccctc ctgagcctct ctctgctcat ctgtcaaag ggtacctcaa ggtcgttgta 45727

- 23 -

aggactcatg agtcgggata accatacttt tcttggatgg acacatcagc accgggcttg 45787
 acatttacc agttcccctt tgatgcctgg tttcctcttt cccggccccc tgaagagggtg 45847
 atctgatttc tgacaggagc cctgaggag gaaatggtcc cctttgttga cttttctttt 45907
 tctttatttt tttcttttga gatttgetgt caccagcct ggaatgcagt ggtgccatct 45967
 tggtcactg ctacctctcc cactgggttc aagcaattct cctgcctcag cctcccaagt 46027
 agctgggatt acaagcatgc gccaccatgc ctggctaagt tttgtatttt tagtacagac 46087
 agggtttctc catgggtggcc aggctggtct tgaactcctg acctcagggtg atcctccac 46147
 ctctgcctcc cgaagtgcta cgattacagg catgagccac cgcgcccata cccctttgtt 46207
 gacttttctc atcctctgag aaagtctcag ttgaggccag cacctccctc aagtgaattg 46267
 aatctccctt ttgaacaaca acaaataaca atatgacca gacgtggtgg ctacacctg 46327
 tgggtccagc tactcgggag gctgagggtg gaggattgct tgagcccagg aggtcaaggc 46387
 tacagagagc tataatcaca ccacttcaact ccagcctggg ggacaaagt aaaccctgtc 46447
 tgaaaaaaac aaaaaagaa aaaggaaaaa gaaacaatac gatcaciaag tagatattca 46507
 tagtgtttat tttcagtact cttttttttt tttttttttt tttttgagac ggagtcttgc 46567
 tctgttgccc aggctggagt gcagtggcac gatcttggct cactgcagcc tctgcctccc 46627
 aggttcaagc gcttggctca ctgcaacctc cgcctcctgg gttcaagcgc ttcttctgccc 46687
 tcagcctccc cagtagctgg gactataggc acgtccact acgccagct aattttttgt 46747
 attttttagt agagatggg tttcactatg ttagccagga tggctctgat ctctgacct 46807
 cgtgatctgc ctgccttggg ctcccaaagt gttgggatta tgggcatgag ccactgcacc 46867
 tggccttttt tttttttttt ttgagatgg agtttcgctc ttgttgcca ggctggagtg 46927
 caatggtgtg atctcggtc actgcaacct ctgcctcctg ggttcaagca attctcctgc 46987
 ctacgcctcc cgagtagctg ggattacagg cacctgccac cagcctggc taatttttgt 47047
 acttttagta gagacggggt ttctccatgt tggtcaggct ggtctcaaac tcctgacctc 47107
 aggtgatcca cccacctcg cctcccaaag ttctgggatt acagacatga gccaccgcgc 47167
 ctggccgtgt ctggcctttt ttagttattt cttttttttt tttttttttt ttgagacag 47227
 agtcttactc cgtcgcccag gctggagtgc agcgggtgca tgtctgcgca ctgcaagctc 47287
 cgccccctgg gttcatgcca ttctcctgcc tcagccttct gagtagctgg gactgcaggc 47347
 gcctgccact acgcccggct acttttttgt atatttagta gagatggagt ttactgtgt 47407
 tagccaggat ggtctcgatc tctgacttt gtgatccgcc cgcctcggcc tcccaaagtg 47467
 ctgggattac aggcgtgagc caccatgcca ggcttttttt tttttttttt tttttgagac 47527
 ggagtcttgc tctgtcgccc aggctggagt gcagtgccat gatctcagct cactgcaagc 47587
 tccacttccc aggetcacgc cattctccag cctcagcctc ccaagtagct gagactacag 47647
 gggcccgcga ccacactcgg ctaatttttt tgtattttta gtagagacgg ggtttcacca 47707
 tgttagccag gctggtcttg aactcctaac ctcaggcgat tcacctgcct cggcctccca 47767
 aagtgtggg attaaaggta tgagccacct cgcctggtgt gagccacctc gccagcctg 47827
 agccacctca cccagcctaa gccactgtgc ctggcctgat tttggacttt ttaaaaattt 47887
 tattaataat tatttttggg tttctttttt ttgagacagg gtcttactct gtcacccagg 47947
 ccactctgtc tgtctgtcat cccagtgatg ggatcatacc ttgctgcagc ctctacctcc 48007
 tgggtcaag cgatcctccc cctcagcct cctgagtagc tgggagtaca ggtgtgcacc 48067
 accacacctg gctaattttt tttttttttt ttgtatatag agatgggtatt ttgccatgtt 48127
 gaccaggcta gtcttaaact cctggactca ctcaagagat cctcctgcct tggcctccca 48187
 aggtcatttg agactttcgt cattaggcgc acacctatga gaagggcctg caggcacgtg 48247

- 24 -

gcactcagaa gacgtttatt tattotttca g ag gct gag gct gca gtg gcc acc 48301
lu ala glu ala ala val ala thr
695 700

cag gag aca tcc acc gtc agg cta aag gtc agc tcc aca gcc gta agg 48349
gln glu thr ser thr val arg leu lys val ser ser thr ala val arg
705 710 715

aca cag cac aca acc acc cga cct gtt ccc gac acc tcc cgg ctg cct 48397
thr gln his thr thr thr arg pro val pro asp thr ser arg leu pro
720 725 730

ggg gcc acc cct ggg ctc acc acg gtg gag ata gtg aca atg tct cac 48445
gly ala thr pro gly leu thr thr val glu ile val thr met ser his
735 740 745

caa g gtaaagactg ggccctccct aggccctct tcacccagag acgggtccct 48499
gln a
750

tcagtggcca cgaacatttt ggtcacgaga tggagtccag gtgtcgtcct cactcccttg 48559
ctgaccttct ctacttggg ccgtgtgtct ctgggccctc agtttcccta tctgtaaagt 48619
gggtctaata acagttcttg ccctctttgc aaggattaaa tggggccaaat catatgaggg 48679
gccaggtcct tcaggctcct ggttcccaaa gtcagccacg caccgtgtgg gtcccaaaat 48739
tttatcaagg cacattcgtt gcctcagctt caggcatctg cccaaaaagg ccaggactaa 48799
ggcaaggaga gggagggatt cctcagtact cagcttttca cagaggctcc aaaaggctaa 48859
ggaatccagt aacgttttaa cacaatttta caattttttt ttttgagacg gagttttgct 48919
cttgttgccc aggttgagg gtcagtggcac gatctcggct cactgcaacc tctggetccc 48979
gggttcaagc gattctcctg cctcagtctc ccgagtagct gggattacag gcatgcgcca 49039
ccacgctcgg ctaattttgt atttttagta cagaaggggc ttctctgttg gtcaggctgg 49099
tcgtgaacte tcaacctcag gtgagccacc cgcctgagcc tcccaaagt gctgggattac 49159
aggtgtgagc caccacgctt ggctttttt ttgagacaga gtctcgtct cgcctatgct 49219
gtactgcagt gacgcagtct gggctcactg taacctccgc ttcccagggt caagtgattc 49279
ttctgccgca gcctcccatg tagagtagct gggattacag gcacccgcca ccatgcctgg 49339
ctaattcttg ctttttagt agagatgggg ttccacagt gttggccaggc tgggtctcaa 49399
cttctgacct caagtcatct gcctgccttg gccctgccaa agtgctggga ttatagatgt 49459
gagccaccgc gcctggccta cagtttattc tttggtggct cacacctgta atctcagcac 49519
tttgggaggc caaggtggga gaatggcttg agcccaggag ttcaagtcca gcctgggcaa 49579
catagcaaga ccctatctct actacaaaat aaataataaa taaaactaatt ttttttcttt 49639
taaaacccaa ctattcaaca tggcaatgca atatattaaa aaaatttttt ttttctttga 49699
aacggagtct ctactgtca cccgggcttg agtgcagtgt cgccatcttg gctcactgca 49759
acctccgct cccaggtcca agtgattctc ctgcttcagc ctcccagta gctgggatta 49819
caggcaccca ccaccatacc cagctaatat ttttgattt ttagtagaga tggggtttca 49879
ctatgttggg caggctgggc tggaaactcct gacctcgtga tctgcccag gatcggcggc 49939
ctcccaaagt gctggggatt gcaggcatga gccaccgtgc ccagccaaaa cttttttatt 49999
tttatttttt tgggacacgg tctcactgtg taccacagac tggagtgata gagtgtgtc 50059
atggctcact gcagcctcaa cctccctggg ctcaggtgat ctccctgctt cagtctccca 50119

- 25 -

ggtagctggg actacaggca tgagccacca caccagcta atttttgaat tttttttag 50179
 agacaggggtt tcaccttggtg gccagactt gtctctaact ccagggctca agcgatctgc 50239
 ccaccttggc ctcccaaagt gctgagatta atgcaattta aaaaattttt tggccaggcc 50299
 tgggtggctca tgacctgtatt cacaacacct tgggaggcaa aggtgggcag atcacttgag 50359
 gtcaggagtt cgagactagc ctggccaaca tggtgaaacc ccctgtctac taaaaaata 50419
 caaaaattac ctgggcacag tgggtgggtgc ctgtaatccc agctacttgg gatgctgagg 50479
 gtggagaatt gcttgaacct gggaggcaga agttgcagta agccaagatc atgccactgg 50539
 actccagcct cagtgcaga gcaaaactct gtctccaaaa aaattgtttt tttttttttt 50599
 ttttcaaatc atcacactac agccaaggcc tggccactta cttttgtaaa taaagtttta 50659
 ttggagccag tggaccagtg aggccgaatc ttgcagggtg aagatcacag tctatccttg 50719
 aaaaattttga tattttgttc attgggtgggt ttttcattaa tttaaatttt aaaaaataac 50779
 atattaaagg ctggtgtgga ggtgcacgcc tgcagtccta gctactccca gaggctgagg 50839
 cgggagactt gcttgagccc aagagttgaa gtccagcctg ggcaacatag cgagaccccc 50899
 atctctaaaa ataaaaataa tgcattagaa tattattgga ttcttgggca gggcacagtg 50959
 gctcacacct gtaatcccag cactttggga ggctgagggtg ggtggatcac ctgagggtcag 51019
 gagtttgaga ccagcctggc caacatggtg aaaccccgtc tctactaaaa atacaaaaat 51079
 tagccaggcg tgggtggcagg tgacctgtaat ccagctact cgggaggctg aagcacgaga 51139
 atcgcttgaa tccaggaggc ggaggttgca gtgagctgag attgcgccat tgcactccag 51199
 cctggaggac aagagtgaat ctccattccc ctctgcaaag aaaaggaata ttatcagatt 51259
 cctaagcttt ttggctcccc cttagatttg ggggctgggg tggtgagtgt ctgacctggc 51319
 ctactgtcc tccctggatg tgatgagacc cagggtgtggg tcaggatgtc attcgtttgt 51379
 ccaccagagg gcgccccaaac tgctttgagc tgctgggaaa tggtgctcct agacttttag 51439
 caaacaaca aaaaaaatg gcacatcggc aaatttcaga ccattctttt tttttttttt 51499
 tttggttcca gagtagctga aatctttgtt cagttacaag caggataaaa tggaaactgc 51559
 ctgggagagg ctgagaaacc ttcttgcttg ggggagggtg ggcaactgta gaattaatcg 51619
 cttcacagac cagcccatcc aggactcctc aaatttggca aaaaagccat tcattcattc 51579
 attcatttat gtagagacga gggggatctg gctatattgc ctagatttgt ctcaaattcc 51739
 tggcctcaag tgatcctcct gccttggctc actaatgtgc tgcgattaca ggcatgagcc 51799
 accgtgccta gctctagtgg acttgaaatg ttgccttgcc cagggccctt atgttgaatg 51859
 gccaggtcc acttgatagg ttctgtacca aggttaaccc catcccataa tgcctgggac 51919
 agttgatgca ggacaatcag cttctgtgcc attcaacctc aggactgagc atgctgggca 51979
 ttgtggggtc cgaagggtggc tccctgtcc cttcaaaaat accctctttt tcttttcttc 52039
 tttttttttt tttttttttt ttgagacgaa gtcttgcctc gttgccccag ctagagtga 52099
 gtggtgcat ctcagctccc cgcaacctct gcttcccggt ttcaggcgat tctcctgcct 52159
 cagcctcctg agtagctggg attacagggtg cccaccgcca cagctggcta atttttgtat 52219
 ttttagtaga gacagggttt caccgtgttg gccaggctgg tcttgaactc ctgacctcag 52279
 gcaacctgcc cacctcagcc tcccaaagtg ctgggattac aggtttgagc cactgggcct 52339
 ggcctttttt tttttttttt gagaggaggt ctcactctgt tgcccaggct ggagtgaat 52399
 ggcgcatct tgaactactg caactccatt tcccgggttc aagtgttct cctccctcag 52459
 cctcccaagt agctgggatt acagggtgcat gccaccacgg ccagctaatt ttgtattttt 52519
 agtagagaca gggtttcaat atgttgatca tgctggtctc aaactcctga ccttaggtga 52579
 tctgcccgc ttagcctccc aaagtgttg gattacaggt gtgagccacc gcgcccagac 52639

- 26 -

caaaatatgc tcattttaat aaaatgcaca agtaggttga caagaatttc acctgcaacc 52699
 ttgtcaacca cctagaataa aagcctctgc agccctcccc taaagactca tcaatgtgag 52759
 gctcaagaac cttcttaggc tgggctcggg ggctcatttc tgtaatccct gcactttgga 52819
 aggctgaggg aggaggatct cttgaggcca ggagttcaag acaagcctgg gcaacatagc 52879
 cagacctctg tttctatccc ccacaaaaag aaccttctta aaccggaatt gagtcctaca 52939
 acctcgataa ctcacaaata agcccggtg gctctcaca gacttgggaa gttctccaag 52999
 tgtccaggga gatgtgccag gcgctttcct gccgtgacca ccgtcctctg cctgctccat 53059
 ttcttggtgg ccttccttta gacctgggcc tcaactcttgc ttctctcctg cag ct ctg 53117
 la leu
 750
 ggc gac gtt gct ggc aga gga aat gag aag aag ccc agt agc gtg agg 53165
 gly asp val ala gly arg gly asn glu lys lys pro ser ser val arg
 755 760 765
 gct ctg tcc att gtc ctc ccc atc g gtaagcgcgg gccgggtcccc 53210
 ala leu ser ile val leu pro ile v
 770 775
 cagcgtcccc caggtcacag cctcccgtca tgtgacctcg tgcctggctg gttgggcctg 53270
 ttcacttttt ctcctggaca gggaacagcc ccaactggtgt cctttatcac ccccacggcc 53330
 tctcctggct tggggctgac agtgacaaga tcagacagct aaggggtcag atggaggatg 53390
 tggagctggg tcccgtgctg tggaatagcc tcaccgagat ttgagtgcct tctggggaac 53450
 tggttccctt gcagggggct gtgtggagag gcgcgctctc cctgcctcac ccatgctcat 53510
 cctaactcgg ttaccatcac atctcttttt tctttttttc ttaaatttta agaaaaaaga 53570
 aatttaattt ttttgagaga cagagtcttg ctctgtcacc caggctggag tgcagtggca 53630
 ccatcatgcc tcgctgcagc ctcaatgtct gggctcaagc gatcctccca cctcagcctc 53690
 ctgagtagct ggtgcaagcc actatacccc acttcctatt tcttaaaaag tcacagccct 53750
 gtgtgtggct aatcctggac agaaatctag aagaagtcag ctacttctgg ggcgtggctc 53810
 acccagtggt cttcagggtta gatatttctt atacttatga ggctgggtgt ggtggcttat 53870
 gcctgtaatc ccagcacttt gggaggctga agtgggtgga ttgcttgggc tcaggagttc 53930
 gagaccaacc tgggcaacat ggcgaaaccc tgtttctaga aaaggtaaa aaattagctg 53990
 ggcaggtggc acgtgcctgt ggtaccagct acttgagggc ctgaggcagg aggatcgctt 54050
 gaacctggga ggtcgagggt gcagtgaact gagatcatgt cactgcactc cagcctgggtg 54110
 acagagcaag acccgtctc aaaaaaaaaa aaagaaagaa aaaaattctt atgcatagat 54170
 ttgcctcttt tctgtttgtt tgttttgaga tggagtctcg ctctgtcgcc caggctggag 54230
 tacagtggct caacctcggc tcaactgcaac ctctgcctcc cgggttcaag caattctcct 54290
 gcctcagcct cctgagtagc tgggactaca gcgccgccca ccatgcccag ctaatttttg 54350
 tatttttagt agagactgac tgggtttcat catgttggcc aggctggtct cgaactcttg 54410
 acctcatgat ccgccgcct cagcctccca aaatgctggg attacaggcg tgagccacca 54470
 ggcccaggcc gcaaggcgat ctctaaacaa acataaaaga ccaggagtca aggttatggt 54530
 acgatgcccg tgttttcaact ccagccacgg agctgggtct ctggtctcgg gggcagctgt 54590
 gtgacagagc gtgcctctcc ctacag tg ctc ctc gtc ttc ctt tgc ctg ggg 54642
 al leu leu val phe leu cys leu gly
 780

- 27 -

gtc ttc ctt cta tgg aag aac tgg cgg ctt aag aac atc aac agc atc 54690
 val phe leu leu trp lys asn trp arg leu lys asn ile asn ser ile
 785 790 795 800
 aac ttt gac aac ccc gtc tat cag aag acc aca gag gat gag gtc cac 54738
 asn phe asp asn pro val tyr gln lys thr thr glu asp glu val his
 805 810 815
 att tgc cac aac cag gac ggc tac agc tac ccc tcg gtgagtgacc 54784
 ile cys his asn gln asp gly tyr ser tyr pro ser
 820 825
 ctctctagaa agccagagcc catggcggcc ccctcccagc tggaggcata tgatcctcaa 54844
 gggaccaggc cgaggcttcc ccagccctcc agatcgagga cagcattagg tgaatgcttc 54904
 tgtgcgctca ttcagaatgt cagcggacaa tggccttggg ggtgtagagg aatgttggat 54964
 aagcaaatag agagctccat cagatggtga cagggcaaaag aaagtcaaaa ggagttcaga 55024
 ggccggggcgc ggtgggctcat gcctgtaatc ccaggacttt gggaggccga ggctggcgga 55084
 tcacctgaag tcaggagttt gagaccagct tggccatcat gacaaaaccc cgtctctatt 55144
 aaaaatacaa aaaattagcc aggcgtggga gtgggcgcct gtaatcccag ctactcggga 55204
 ggccgaggta gaaaaatcgc ttgaacctag gaggcagagg ttgcagtga cagagatcgc 55264
 gccactgcat tccagcccg gaggcaagag caaaactcca tctcaaaaaa aaaaaaaaaa 55324
 ggagttcaga ggcccggcat ggtgggttac acatgtgatc ccagaacttg gggaggttga 55384
 ggcaggagaa tcacctgagc tcagagttca agaccagcct gggcagcaca gcaagacccc 55444
 atctctgcaa aaaataaaaa tttagcccag tgtggtgatg agcgcctagt tccagctact 55504
 agggaggcta aggcaggagg attgcttgag gctaaggtag gagattgaga ctgcagtga 55564
 ttgtgattgc gtcactgccc tccagcctgg gtgacagagc aagcccttgt ctcttaaaaa 55624
 aaaaaaaaaa ttcaaagaag ggtttccaga gggccaggag ggaggaagg agaggagggtg 55684
 ttttattttt ttgcttttat tttttatttt gagacagagt ctctctctgt caccaggtt 55744
 ggagtgcagt gctgtgatct tggctcactg caacttctgc ctctgggtt caagcaattc 55804
 ttatgcctca gcctcagcct cctgagtagc tgggattaca aactatgcc cgggtaattt 55864
 ttgtattttt agtagagacg aggtttcgcc atgttgccca gactgggtct gaactcctga 55924
 cctcaagtga tccaccgcc ttggcctccc cagtgctgg gattgcaggc gtgagccact 55984
 gcgcccgcct tgatctttac acaaggggtt tagggtaggt agccttctct gaaccaggag 56044
 aacagcctgt gcgaaggccc tgaggctgga ccgtgcctgt tgggtttgag gccgttgtag 56104
 ctggagcaaa cagagagagg ggtaaaaagg caggaggcta ccaggcaggt tgtgcagagc 56164
 cttgtgggcc actggggagg actttggctt ttgcctgag agcgggtggga agtgactgaa 56224
 tccggtactc accgtctccc tctggcggct cctgggggaa catgcttggg gatcaggctg 56284
 ggggaggctg ccaggcccag gaggtgagaa gtaggtggcc tccagccgtg ttctctgaat 56344
 gctggactga tagtttccgc tgtttaccat ttgttggcag aga cag atg gtc agt 56399
 arg gln met val ser
 830
 ctg gag gat gac gtg gcg tgaacatctg cctggagtcc cgtccctgcc 56447
 leu glu asp asp val ala
 835 839
 cagaaccctt cctgagacct cgccggcctt gttttattca aagacagaga agaccaaagc 56507

- 28 -

attgcctgcc agagctttgt tttatatatt tattcatctg ggaggcagaa caggcttcgg 56567
 acagtgccca tgcaatggct tgggttggga ttttggtttc ttcttttcct cgtgaaggat 56627
 aagagaaaca ggcccggggg gaccaggatg acacctccat ttctctccag gaagttttga 56687
 gtttctctcc accgtgacac aatcctcaaa catggaagat gaaaggggag gggatgtcag 56747
 gccagagaa gcaagtggct ttcaacacac aacagcagat ggcaccaacg ggacccctg 56807
 gccctgcctc atccaccaat ctctaagcca aaccctaaa ctcaggagtc aacgtgttta 56867
 cctcttctat gcaagccttg ctagacagcc aggttagcct ttgccctgtc acccccgaat 56927
 catgaccac ccagtgtctt tcgagggtggg tttgtacctt ccttaagcca ggaaaggat 56987
 tcatggcgtc ggaaatgac tcggtgaatc cgtggtggca ccgagaccaa actcattcac 57047
 caaatgatgc cacttcccag aggcagagcc tgagtactg gtcaccctta atatttatta 57107
 agtgccctgag acaccgggtt accttggccg tgaggacacg tggcctgcac ccagggtgtg 57167
 ctgtcaggac accagcctgg tgcccatcct ccgacccct acccacttcc attcccggtg 57227
 tctccttgca ctttctcagt tcagagttgt aactgtgta catttgcat ttgtgttatt 57287
 attttgact gtttctgtc gtgtgtgttg ggatgggatc ccaggccagg gaaagcccgt 57347
 gtcaatgaat gccggggaca gagaggggca ggttgaccg gacttcaaag ccgtgatcgt 57404
 gaatatcgag aactgccatt gtcgtcttta tgtccgcca cctagtgtt ccacttctat 57467
 gcaaatgcct ccaagccatt cacttcccca atcttgtcgt tgatgggtat gtgttataaa 57527
 catgcacggt gaggccgggc gcagtggctc acgcctgtaa tcccagcact ttgggaggcc 57587
 gaggcgggtg gatcatgagg tcaggagatc gagaccatcc tggctaacac gtgaaacccc 57647
 gtctctacta aaaatacaaa aaattagccg ggcgtggtg cgggcacctg tagtcccagc 57707
 tactcgggag gctgaggcag gagaatggtg tgaacccggg aagcggagct tgcaagtgc 57767
 cgagattgcg ccaactgcagt ccgcagtcgt gcctgggcca cagagcgaga ctccgtctca 57827
 aaaaaaaaa acaaaaaaaaa accatgcatg gtgcatcagc agcccatggc ctctggccag 57887
 gcatggcgag gctgagggtg gaggatggtt tgagctcagg catttgaggc tgtcgtgagc 57947
 tatgattatg ccaactgctt ccagcctggg caacatagta agacccatc tcttaaaaaa 58007
 tgaatttggc cagacacagg tgcctcacgc ctgtaatccc agcactttgg gaggctgagc 58067
 tggatcactt gagttcagga gttggagacc aggcctgagc aacaaagcga gatcccatct 58127
 ctacaaaaac caaaaagtta aaaatcagct gggtagcgtg gcacgtgcct gtgatcccag 58187
 ctacttggga ggctgaggca ggaggatcgc ctgagccag gaggtggagg ttgcagtgc 58247
 ccatgatcga gccactgcac tccagcctgg gcaacagatg aagaccctat ttcagaaata 58307
 caactataaa aaaataaata aatcctccag tctggatcgt ttgacgggac ttcaggttct 58367
 ttctgaaatc gccgtgttac tgttgactg atgtccggag agacagtgc agcctccgtc 58427
 agactcccgc gtgaagatgt cacaaggat tggcaattgt ccccaggga aaaacactgt 58487
 gtcccccca gtgcaggga ccgtgataag ctttcttggg ttccggagcac gtaaatgcgt 58547
 ccctgtacag atagtgggga tttttgtta tgtttgact ttgtatattg gttgaaactg 58607
 ttatcactta tatatatata tatacacaca tatatataaa atctatttat ttttgcaaac 58667
 cctggttgct gtatttgttc agtgactatt ctggggccc tgtgtagggg gttattgcct 58727
 ctgaaatgcc tcttctttat gtacaaagat tatttgcacg aactggactg tgtgcaacgc 58787
 tttttgggag aatgatgtcc ccgttgatg tatgagtggc ttctgggaga tgggtgtcac 58847
 tttttaaac actgtataga aggttttgt agcctgaatg tcttactgt atcaattaaa 58907
 tttcttaaat gaaccaattt gtctaaactc gatgcacgtt cttctgttcg cgcgttctt 58967
 tttgtttttt tttttttcct gagatggagc ctggctctgt caccctggc tggagtgcag 59027

- 29 -

```

tggcatgata tgggcttact gcaagctccg cctcccagggt tcaagcaatt ctccctgcctc 59087
agcctcccta gtagctagga ttacagggtga gtgccaccac gcctggccaa tttttttttt 59147
tttttttttt ttgagacaga gtctcgctct gtcaccagg ctggagtga gtggtgtgat 59207
ctcggtcac tgcaagctct gcctcccagg ttaatgccat tctcctgtct cagcctcctg 59267
agtagctggg gccacaggcg cctgccacca cgcccggcta attttttttt gtacttcttt 59327
tagtacagac ggggtttcac catgttagcc aggatggtct cgatctcctg accttgtgat 59387
ccacctgctt cggcctccca aagtgtgag attacaggcg tgagccaccg cgggtggcca 59447
acgctaattt ttttgttttt ttagatggag tcttgtctct tggcccaggc tggagtgcag 59507
tggcgtgata tctgcctact gcaagctccg cctcccgggt tcatgccatt ctccctgcctc 59567
agcctcctga gtaactggga ctacaggcac ccgccaccac gcccggttaa ttttttgtat 59627
tttttagtaga gacagggttt caccgtgtta gccaggatgg tcttgatctc ctgaccttgt 59687
gatccacccg tctcggcctc ccaaagtgtc gggattagag gtgtgagcca ccacacctgg 59747
cctagcctgg ctaatttttg tatttttggt agagacgggg tttcacctatg ttggtcaggc 59807
tggtcttgaa cttctgacct caggtaatct gcctgcctca gtctcccaa gtgctgggat 59867
tacagggtgt agccaccgag cctggcctca ctcccttctg tcatctgttt gtggattgga 59927
ctcccagga gaaggaccca gaagggaag actcccagaa ctccgggcaa gatgcaatct 59987
ccgtgggctg cca 60000

```

<210> SEQ ID NO.: 2

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex1F

<400>

cacattgaaa tgctgtaa gacg

<210> SEQ ID NO.: 3

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex1R

- 30 -

<400>

ctattctggc gcctggagca agcc

<210> SEQ ID NO.: 4

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex2F

<400>

ttgagagacc ctttctcctt ttcc

<210> SEQ ID NO.: 5

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex2R

<400>

gcatatcatg cccaaagggg

<210> SEQ ID NO.: 6

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex3F

<400>

ttcctttgag tgacagttca atcc

- 31 -

<210> SEQ ID NO.: 7

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex3R

<400>

gataggctca atagcaaagg cagg

<210> SEQ ID NO.: 8

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Mut191-2F

<400>

acagttcaat cctgtctctt ctct

<210> SEQ ID NO.: 9

<211> 10

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex4AF

<400>

gtggtctcgg ccatccatcc

<210> SEQ ID NO.: 10

<211> 20

<212> polinucleótido

- 32 -

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex4ARF

<400>

agccatcttc gcagtcgggg

<210> SEQ ID NO.: 11

<211> 12

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Mut 509insCR

<400>

cgagccatct tcgcagtcgg ag

<210> SEQ ID NO.: 12

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex4BF

<400>

ccccagctg tgggcctg

<210> SEQ ID NO.: 13

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

- 33 -

<223> Ex4BR

<400>

cgccccccacc ctgccccgcc

<210> SEQ ID NO.: 14

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex6F

<400>

tctctcttcc tctctctggc

<210> SEQ ID NO.: 15

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex6R

<400>

tctgcaagcc gcctgcaccg

<210> SEQ ID NO.: 16

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> MutC255GF

<400>

ctctggctctc acagtgcacac gc

- 34 -

<210> SEQ ID NO.: 17

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Mut E291XR

<400>

gcaccgagac tcaccgcaat

<210> SEQ ID NO.: 18

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex7F

<400>

ggcgaagggg tgggtagggg

<210> SEQ ID NO.: 19

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex7R

<400>

gttgccatgt caggaagcgc

<210> SEQ ID NO.: 20

<211> 20

<212> polinucleótido

- 35 -

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex9F

<400>

cccctgacct cgctccccgg

<210> SEQ ID NO.: 21

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex9R

<400>

gctgcaggca ggggcgacgc

<210> SEQ ID NO.: 22

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex10F

<400>

atgcccttct ctctctctgc

<210> SEQ ID NO.: 23

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

- 36 -

<223> Ex10R

<400>

agccctcagc gtcgtggata

<210> SEQ ID NO.: 24

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Mut1432delGF

<400>

gggacatcca ggcccccgcc

<210> SEQ ID NO.: 25

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex11F

<400>

tcctcccccg ccctccagcc

<210> SEQ ID NO.: 26

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex11R

<400>

gctgggacgg ctgtcctgcg

- 37 -

<210> SEQ ID NO.: 27

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex13F

<400>

gtcatcttcc ttgctgcctg

<210> SEQ ID NO.: 28

<211> 30

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex13R

<400>

ttccacaagg aggtttcaag gttggggggg

<210> SEQ ID NO.: 29

<211> 13

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> MutH635NR

<400>

acctcttggc tgggtcaggt tct

<210> SEQ ID NO.: 30

<211> 20

<212> polinucleótido

- 38 -

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex14F

<400>

aaattttctgg aatctttctgg

<210> SEQ ID NO.: 31

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex14R

<400>

gcagagagag gctcaggagg

<210> SEQ ID NO.: 32

<211> 22

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex15F

<400>

gaagggcctg cagcacgtgg ca

<210> SEQ ID NO.: 33

<211> 19

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

- 39 -

<223> Ex15R

<400>

tagggagggc ccagtcctt

<210> SEQ ID NO.: 34

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex17F

<400>

gggtctctgg tctcggggc

<210> SEQ ID NO.: 35

<211> 22

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex17R

<400>

ggctctggct ttctagagag gg

<210> SEQ ID NO.: 36

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgggtcggga cactgcctgg cag

- 40 -

<210> SEQ ID NO.: 37

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgggtcggga ccctgcctgg cag

<210> SEQ ID NO.: 38

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgccaggca gtgtcccgac ccg

<210> SEQ ID NO.: 39

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgccaggca ggggtcccgac ccg

<210> SEQ ID NO.: 40

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

- 41 -

<400>

atgcatttcc cgtcttggca ctg

<210> SEQ ID NO.: 41

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gatgcatttc cctcttggca ctg

<210> SEQ ID NO.: 42

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gatgcatttc ccgtcttggc actgg

<210> SEQ ID NO.: 43

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agatgcattt ccctcttggc actgg

<210> SEQ ID NO.: 44

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

- 42 -

<220>

<221> cebador

<400>

tgtctcttct gtagtgtctg tcacc

<210> SEQ ID NO.: 45

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtctcttctg tctgtgtctg tcacc

<210> SEQ ID NO.: 46

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgtctcttc tgtagtgtct gtcacct

<210> SEQ ID NO.: 47

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgtctcttct gtctgtgtct gtcacct

<210> SEQ ID NO.: 48

<211> 23

- 43 -

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggccgtgtca accgctgeat tcc

<210> SEQ ID NO.: 49

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gccgtgtcaa ccgctgcatt c

<210> SEQ ID NO.: 50

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

aggaatgcag cgtttgacac ggccc

<210> SEQ ID NO.: 51

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gaggaatgca gcgtttgaca cggcccc

- 44 -

<210> SEQ ID NO.: 52

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agctgtgggg gccgtgtcaa ccg

<210> SEQ ID NO.: 53

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agctgtgggg gcgtgtcaac cgc

<210> SEQ ID NO.: 54

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cggttgacac ggccccaca gct

<210> SEQ ID NO.: 55

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

- 45 -

<400>

gcggttgaca cgccccaca gct

<210> SEQ ID NO.: 56

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

caaggctgtc gtaagtgtgg c

<210> SEQ ID NO.: 57

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcaaggctgt cgtaagtgtg gcc

<210> SEQ ID NO.: 58

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

caaggctgtc gttaagtgtg gcc

<210> SEQ ID NO.: 59

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

- 46 -

<220>

<221> cebador

<400>

aaggctgtcg ttaagtgtgg c

<210> SEQ ID NO.: 60

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gacaacgacc ccgactgcga agatg

<210> SEQ ID NO.: 61

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gacaacgacc cccgactgcg aagat

<210> SEQ ID NO.: 62

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acaacgaccc cgactgcgaa gat

<210> SEQ ID NO.: 63

<211> 23

- 47 -

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acaacgaccc ccgactgcga aga

<210> SEQ ID NO.: 64

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcggccactc atccgagcca tct

<210> SEQ ID NO.: 65

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcggccactc acccgagcca tct

<210> SEQ ID NO.: 66

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgcgccact catccgagcc atctt

- 48 -

<210> SEQ ID NO.: 67

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgccggccact caccgcgagcc atctt

<210> SEQ ID NO.: 68

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccagctggcg ctgtgatggt ggc

<210> SEQ ID NO.: 69

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccagctggcg ccgtgatggt ggc

<210> SEQ ID NO.: 70

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

- 49 -

<400>

tccagctggc gctgtgatgg tggcc

<210> SEQ ID NO.: 71

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tccagctggc gccgtgatgg tggcc

<210> SEQ ID NO.: 72

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgcaaggac aaatctgacg aggaa

<210> SEQ ID NO.: 73

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgcaaggac aactgcggta tgggc

<210> SEQ ID NO.: 74

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

- 50 -

<220>

<221> cebador

<400>

actgcaagga caaatctgac gaggaaa

<210> SEQ ID NO.: 75

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

actgcaagga caactgcggt atgggacg

<210> SEQ ID NO.: 76

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

caaatctgac gaggaaaact gcggt

<210> SEQ ID NO.: 77

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

caaatctgac gacaaatctg acgag

<210> SEQ ID NO.: 78

<211> 27

- 51 -

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acaaatctga cgaggaaaac tgcggta

<210> SEQ ID NO.: 79

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acaaatctga cgacaaatct gacgagg

<210> SEQ ID NO.: 80

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gggtccctcg cagagtgtca ctg

<210> SEQ ID NO.: 81

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gggtccctcg ccgagtgtca ctg

- 52 -

<210> SEQ ID NO.: 82

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgggtccctc gcagagtgtc actgt

<210> SEQ ID NO.: 83

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgggtccctc gccgagtgtc actgt

<210> SEQ ID NO.: 84

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

aacccatcaa agagtgcggt gag

<210> SEQ ID NO.: 85

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

- 53 -

<400>

aaccatcaa atagtgcggt gag

<210> SEQ ID NO.: 86

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gaaccatca aagagtgcgg tgagt

<210> SEQ ID NO.: 87

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gaaccatca aatagtgcgg tgagt

<210> SEQ ID NO.: 88

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tcactctcgg gccctacca

<210> SEQ ID NO.: 89

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

- 54 -

<220>

<221> cebador

<400>

tcactctcgg acccctaccc a

<210> SEQ ID NO.: 90

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cactctcggg cccctaccc

<210> SEQ ID NO.: 91

<211> 19

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cactctcgga cccctaccc

<210> SEQ ID NO.: 92

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acgagtgccct gtgcgccgac ggctt

<210> SEQ ID NO.: 93

<211> 25

- 55 -

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acgagtgcct gtacgccgac ggctt

<210> SEQ ID NO.: 94

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgagtgcctg tgcgccgacg gct

<210> SEQ ID NO.: 95

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgagtgcctg tacgccgacg gct

<210> SEQ ID NO.: 96

<211> 24

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcgaagatgc gaaggtgatt ccgg

- 56 -

<210> SEQ ID NO.: 97

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggcccagcga agatttccgg gtggg

<210> SEQ ID NO.: 98

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agcgaagatg cgaaggatgat ttccggg

<210> SEQ ID NO.: 99

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgcccagcg aagatttccg ggtggga

<210> SEQ ID NO.: 100

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

- 57 -

<400>

tgaagaagag gtaggcgatg g

<210> SEQ ID NO.: 101

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cggttggtga agacgatgga g

<210> SEQ ID NO.: 102

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtgaagaaga ggtaggcgat gga

<210> SEQ ID NO.: 103

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccggttggtg aagacgatgg agc

<210> SEQ ID NO.: 104

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

- 58 -

<220>

<221> cebador

<400>

ctccatcgcc tacctcttct tcacc

<210> SEQ ID NO.: 105

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctccatcgcc taactcttct tcacc

<210> SEQ ID NO.: 106

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gctccatcgc ctacctcttc ttcacca

<210> SEQ ID NO.: 107

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gctccatcgc ctaactcttc ttcacca

<210> SEQ ID NO.: 108

<211> 25

- 59 -

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgccggttg tgaagaagag gtagg

<210> SEQ ID NO.: 109

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtgccggttg gtgagaagag gtagg

<210> SEQ ID NO.: 110

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtgccggttg gtgaagaaga ggtaggc

<210> SEQ ID NO.: 111

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgtgccggtt ggtgagaaga ggtaggc

- 60 -

<210> SEQ ID NO.: 112

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

caatagaatc tactggtctg acctg

<210> SEQ ID NO.: 113

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

caatagaatc tagtgggtctg acctg

<210> SEQ ID NO.: 114

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcaatagaat ctactgggtct gacctgt

<210> SEQ ID NO.: 115

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

- 61 -

<400>

gcaatagaat ctagtgggtct gacctgt

<210> SEQ ID NO.: 116

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggcccccgac gggctggctg tggac

<210> SEQ ID NO.: 117

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggcccccgac ggctggctgt ggact

<210> SEQ ID NO.: 118

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtccacagcc agcccgtcgg gggcc

<210> SEQ ID NO.: 119

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

- 62 -

<220>

<221> cebador

<400>

agtccacagc cagccgtcgg gggcc

<210> SEQ ID NO.: 120

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcggggagttc cccagtcagt ccagt

<210> SEQ ID NO.: 121

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcggggagttc cctagtcagt ccagt

<210> SEQ ID NO.: 122

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cggggagttcc ccagtcagtc cag

<210> SEQ ID NO.: 123

<211> 23

- 63 -

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgggagttcc ctagtcagtc cag

<210> SEQ ID NO.: 124

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgtccccag aggatatggt tctct

<210> SEQ ID NO.: 125

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgtccccag agaatatggt tctct

<210> SEQ ID NO.: 126

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgtccccaga ggatatgggt ctc

- 64 -

<210> SEQ ID NO.: 127

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgtccccaga gaatatgggtt ctc

<210> SEQ ID NO.: 128

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tggttctctt ccacaacctc acc

<210> SEQ ID NO.: 129

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tggttctctt caacaacctc acc

<210> SEQ ID NO.: 130

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

- 65 -

<400>

atggttctct tccacaacct cacco

<210> SEQ ID NO.: 131

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

atggttctct tcaacaacct cacco

<210> SEQ ID NO.: 132

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gctgaccttt agcctgacgg tggat

<210> SEQ ID NO.: 133

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agctgacctt tagctgacgg tggat

<210> SEQ ID NO.: 134

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

- 66 -

<220>

<221> cebador

<400>

agctgacctt tagcctgacg gtggatg

<210> SEQ ID NO.: 135

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gagctgacct ttagctgacg gtggatg

<210> SEQ ID NO.: 136

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgctcctcgt cttcctttgc ctg

<210> SEQ ID NO.: 137

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgctcctcgg ggtctttgcc tgg

<210> SEQ ID NO.: 138

<211> 25

- 67 -

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtgctcctcg tcttcctttg cctgg

<210> SEQ ID NO.: 139

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtgctcctcg gggctctttgc ctggg

<210> SEQ ID NO.: 140

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gactcacagc acgtctcctg ggact

<210> SEQ ID NO.: 141

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gactcacagc acatctcctg ggact

- 68 -

<210> SEQ ID NO.: 142

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

actcacagca cgtctcctgg gac

<210> SEQ ID NO.: 143

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

actcacagca catctcctgg gac

<210> SEQ ID NO.: 144

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccatcgtggc agcgaaactc gtc

<210> SEQ ID NO.: 145

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

- 69 -

<400>

atgcacttcc cacgtcctgg gag

<210> SEQ ID NO.: 146

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

catcgtggca gcgaaactcg t

<210> SEQ ID NO.: 147

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgcacttccc acgtcctggg a

210> SEQ ID NO.: 148

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador Ex8F

<400>

cattgggggaa gagcctcccc

210> SEQ ID NO.: 149

<211> 20

<212> polinucleótido

- 70 -

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador Ex8R

<400>

gcctgcaagg ggtgaggccg

210> SEQ ID NO.: 150

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador Ex12F

<400>

actggcatca gcacgtgacc

210> SEQ ID NO.: 151

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador Ex12R

<400>

cgtgtgtcta tccggccacc

210> SEQ ID NO.: 152

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador Ex16F

<400>

gcgctttcct gccgtgacca

- 71 -

210> SEQ ID NO.: 153

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador Ex16R

<400>

cctgtccagg agaaaaagtg aac

210> SEQ ID NO.: 154

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador MutI771TF

<400>

cagtagcgtg agggctctgt caa

210> SEQ ID NO.: 155

<211> 19

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador Mut2389+4A>GR

<400>

ctgggggacc ggccggcgc

210> SEQ ID NO.: 156

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

- 72 -

<220>

<221> cebador

<400>

tgtcaagctg ggtgctgagg cag

210> SEQ ID NO.: 157

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgtcaagctg gttgctgagg cag

210> SEQ ID NO.: 158

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtcaagctgg gtgctgaggc a

210> SEQ ID NO.: 159

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtcaagctgg ttgctgaggc a

- 73 -

210> SEQ ID NO.: 160

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggtcacctcg agagtgtcac tgt

210> SEQ ID NO.: 161

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggtcacctcg actgtgagag cca

210> SEQ ID NO.: 162

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gtccctcgca gagtgtcact g

210> SEQ ID NO.: 163

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

- 74 -

<221> cebador

<400>

gtccctcgca ctgtgagagc c

210> SEQ ID NO.: 164

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccgtcggggg cctggatgtc t

210> SEQ ID NO.: 165

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cccgtcgggg tctggatgtc t

210> SEQ ID NO.: 166

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cccgtcgggg gcctggatgt ctc

210> SEQ ID NO.: 167

- 75 -

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcccgctcggg gtctggatgt ctc

210> SEQ ID NO.: 168

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccggttggtg aagaagaggt aggcg

<210> SEQ ID NO.: 169

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cggttggtga agaaagaggt aggcg

<210> SEQ ID NO.: 170

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

- 76 -

<400>

gccggttggt gaagaagagg taggcga

<210> SEQ ID NO.: 171

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccggttggtg aagaaagagg taggcga

<210> SEQ ID NO.: 172

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

actggaagct ggcgggacca cag

<210> SEQ ID NO.: 173

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcactggaag ctgggaccac agg

<210> SEQ ID NO.: 174

<211> 23

- 77 -

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgtggtccc gccagcttcc agt

<210> SEQ ID NO.: 175

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cctgtggtcc cagcttccag tgc

<210> SEQ ID NO.: 176

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcgggagttc cccagtcagt c

<210> SEQ ID NO.: 177

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

- 78 -

gcgggagttc accagtcagt c

<210> SEQ ID NO.: 178

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggcgggagtt cccagtcag tcc

<210> SEQ ID NO.: 179

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggcgggagtt caccagtcag tcc

<210> SEQ ID NO.: 180

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cccatcggt aagcgcgggc cgg

<210> SEQ ID NO.: 181

<211> 23

<212> polinucleótido

- 79 -

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccccatcggt aggcgcgggc cgg

<210> SEQ ID NO.: 182

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccggcccgcg cttaccgatg ggg

<210> SEQ ID NO.: 183

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccggcccgcg cctaccgatg ggg

<210> SEQ ID NO.: 184

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gaaaagaggc tggcccaccc ctt

- 80 -

<210> SEQ ID NO.: 185

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gaaaagaggc ttctccttgg ccg

<210> SEQ ID NO.: 186

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

aaaagaggct ggcccacccc t

<210> SEQ ID NO.: 187

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

aaaagaggct tctccttggc c

<210> SEQ ID NO.: 188

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

- 81 -

<220>

<221> cebador

<400>

cgccttcccg tgctcaccca cagcc

<210> SEQ ID NO.: 189

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cgccttcccg tgttcaccca cagcc

<210> SEQ ID NO.: 190

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggctgtgggt gagcacggga aggcg

<210> SEQ ID NO.: 191

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggctgtgggt gaccacggga aggcg

- 82 -

<210> SEQ ID NO.: 192

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

actatctcca ccgtggtgag cccag

<210> SEQ ID NO.: 193

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

actatctcca ccatggtgag cccag

<210> SEQ ID NO.: 194

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgggctcac cacggtggag atagt

<210> SEQ ID NO.: 195

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

- 83 -

<221> cebador

<400>

ctgggctcac catggtggag atagt

<210> SEQ ID NO.: 196

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gggctctgtc cattgtcctc cccat

<210> SEQ ID NO.: 197

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gggctctgtc cactgtcctc cccat

<210> SEQ ID NO.: 198

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

atggggagga caatggacag agccc

<210> SEQ ID NO.: 199

- 84 -

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

atggggagga cagtggacag agccc

<210> SEQ ID NO.: 200

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgcaacatgg ctagagactg ccggg

<210> SEQ ID NO.: 201

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgcaacatgg ctggagactg ccggg

<210> SEQ ID NO.: 202

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

- 85 -

<400>

gcaacatggc tagagactgc cgg

<210> SEQ ID NO.: 203

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcaacatggc tggagactgc cgg

<210> SEQ ID NO.: 204

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgctgatgac ggtgtcatag gaa

<210> SEQ ID NO.: 205

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgctgatgac gatgtcatag gaa

<210> SEQ ID NO.: 206

<211> 21

- 86 -

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gctgatgacg gtgtcatagg a

<210> SEQ ID NO.: 207

<211> 21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gctgatgacg atgtcatagg a

<210> SEQ ID NO.: 208

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tccaaacttc actccatctc aag

<210> SEQ ID NO.: 209

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

- 87 -

tcctaaacttc agtccatctc aag

<210> SEQ ID NO.: 210

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cttgagatgg agtgaagttt gga

<210> SEQ ID NO.: 211

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cttgagatgg actgaagttt gga

<210> SEQ ID NO.: 212

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gccaaagtgga ctgcgacaac ggctc

<210> SEQ ID NO.: 213

<211> 25

<212> polinucleótido

- 88 -

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcccaagtga ctacgacaac ggctc

<210> SEQ ID NO.: 214

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gagccgttgt cgcagtcacac ttggc

<210> SEQ ID NO.: 215

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gagccgttgt cgtagtcacac ttggc

<210> SEQ ID NO.: 216

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgctggcca gggacatgag gagct

- 89 -

<210> SEQ ID NO.: 217

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctgctggcca ggtacatgag gagct

<210> SEQ ID NO.: 218

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agctcctcat gtccctggcc agcag

<210> SEQ ID NO.: 219

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agctcctcat gtacctggcc agcag

<210> SEQ ID NO.: 220

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

- 90 -

<220>

<221> cebador

<400>

ctcgccgcgg cggggactgc aggta

<210> SEQ ID NO.: 221

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctcgccgcgg cgaggactgc aggta

<210> SEQ ID NO.: 222

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tacctgcagt ccccgccgcg gcgag

<210> SEQ ID NO.: 223

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tacctgcagt cctcgccgcg gcgag

- 91 -

<210> SEQ ID NO.: 224

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gaccatcttg gaggatgaaa agagg

<210> SEQ ID NO.: 225

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gaccatcttg gacgatgaaa agagg

<210> SEQ ID NO.: 226

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cctcttttca tcctccaaga tggtc

<210> SEQ ID NO.: 227

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

- 92 -

<221> cebador

<400>

cctctttttca tcgtccaaga tggtc

<210> SEQ ID NO.: 228

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gttttcctcg tcagatttgt ccttgca

<210> SEQ ID NO.: 229

<211> 27

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gttttcctcg tcacatttgt ccttgca

<210> SEQ ID NO.: 230

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ttttcctcgt cagatttgtc cttgc

<210> SEQ ID NO.: 231

- 93 -

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ttttcctcgt cacatttgtc cttgc

<210> SEQ ID NO.: 232

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ttgtccttgc agtcggggcc acta

<210> SEQ ID NO.: 233

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ttgtccttgc agacggggcc accat

<210> SEQ ID NO.: 234

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

- 94 -

<400>

tgtccttgca gtcggggcca cca

<210> SEQ ID NO.: 235

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgtccttgca gacggggcca cca

<210> SEQ ID NO.: 236

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agcccagtag cgtgagggct ctgtc

<210> SEQ ID NO.: 237

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agcccagtag cgagagggct ctgtc

<210> SEQ ID NO.: 238

<211> 25

- 95 -

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gacagagccc tcacgctact gggct

<210> SEQ ID NO.: 239

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gacagagccc tctcgctact gggct

<210> SEQ ID NO.: 240

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tcgccttgct cctcgccgcg gcggg

<210> SEQ ID NO.: 241

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

- 96 -

tcgccttgct ccccgccgcg gcggg

<210> SEQ ID NO.: 242

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cccgccgcgg cgaggagcaa ggcga

<210> SEQ ID NO.: 243

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cccgccgcgg cggggagcaa ggcga

<210> SEQ ID NO.: 244

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acggctacag ctaccctcg gtgag

<210> SEQ ID NO.: 245

<211> 25

<212> polinucleótido

- 97 -

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cggctacagc taccacctcg gtgag

<210> SEQ ID NO.: 246

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctcaccgagg ggtagctgta gccgt

<210> SEQ ID NO.: 247

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctcaccgagg ggtagctgt agccg

<210> SEQ ID NO.: 248

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cccaggagac gtgctgtgag tcccc

- 98 -

<210> SEQ ID NO.: 249

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cccaggagac gtactgtgag tcccc

<210> SEQ ID NO.: 250

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggggactcac agcacgtctc ctggg

<210> SEQ ID NO.: 251

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggggactcac agtacgtctc ctggg

<210> SEQ ID NO.: 252

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

- 99 -

<220>

<221> cebador

<400>

ctcccatcg gtaagcgcg gccgg

<210> SEQ ID NO.: 253

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctcccatcg gtcagcgcg gccgg

<210> SEQ ID NO.: 254

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccggcccgcg cttaccgatg gggag

<210> SEQ ID NO.: 255

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccggcccgcg ctgaccgatg gggag

- 100 -

<210> SEQ ID NO.: 256

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccagtacatg aagctggtgg gaga

<210> SEQ ID NO.: 257

<211> 25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tcttgatcctt ggcctgggga cagag

<210> SEQ ID NO.: 258

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cagtacatga agctggtggg agg

<210> SEQ ID NO.: 259

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

- 101 -

<221> cebador

<400>

cttgatcttg gcctggggac aga

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2004/070001

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. cl7 C12N15/09, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. cl7 C12N, C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, WPI, CIBEPAT, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FOUCHIER SIGRID W. et al. "The molecular basis of familial hypercholesterolemia in the Netherlands" Human Genetics. December 2001 . Vol 109, n° 6, pages 602-615	1-16
X	PISCIOTTA LIVIA et al. "A "de novo" mutation of the LDL receptor gene as the cause of familial hypercholesterolemia". Biochimia et Biophysica Acta. 21 May 2002. Vol 1587, n° 1, pages 7-11	1-16
X	LIND S. et al. "Genetic charecterization of Swe-dish patients with familial hypercholesterolemia A heterogenous pattern of mutations in the LDL receptor gene". Atherosclerosis August 2002 . Vol 163, n° 2, pages 399-407	1-16
X	WO 0206467 A1 (BML, Inc.) 24.01.2002	1-16
A	VARRET M. et al. "Results of the molecular analy-sis of the 220 point mutations in the human LDL receptor gene database". Atherosclerosis. October 1997 . Vol 134, n° 1-2, pages 74-74	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 May 2004 (12.05.04)

Date of mailing of the international search report

11 June 2004 (11.06.04)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2004/070001

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4966837 A (UNIVERSITY OR TEXAS SYSTEM) 30.10.1990.	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2004/070001

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0206467 A	24.01.2002	AU 7106001 A CA 2416533 A EP 1304374 A EP 20010950004	30.01.2002 15.01.2003 23.04.2003 17.07.2001
US 4966837 A	30.10.1990	WO 8604090 A AU 5306586 A SE 8603591 A FI 863474 A NO 863438 A DK 409286 A NL 8520436 T EP 0205574 A EP 19860900490 GB 2178743 AB BR 8507148 A HU 41338 A JP 62501327 T DE 3590702 T US 4745060 A CH 671776 A	17.07.1986 29.07.1986 26.08.1986 27.08.1986 27.08.1986 28.08.1986 03.11.1986 30.12.1986 16.12.1985 18.02.1987 31.03.1987 28.05.1987 04.06.1987 16.07.1987 17.05.1988 29.09.1989 29.09.1989 29.09.1989

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2004/070001

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C12N15/09, C12Q1/68

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ C12N, C12Q

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, CIBEPAT, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	FOUCHIER SIGRID W. et al. "The molecular basis of familial hypercholesterolemia in the Netherlands". Human Genetics. Diciembre 2001. Vol 109, n° 6, páginas 602-615.	1-16
X	PISCIOTTA LIVIA et al. "A "de novo" mutation of the LDL receptor gene as the cause of familial hypercholesterolemia". Biochimia et Biophysica Acta. 21 Mayo 2002. Vol 1587, n° 1, páginas 7-11.	1-16
X	LIND S. et al. "Genetic charecterization of Swedish patients with familial hypercholesterolemia A heterogenous pattern of mutations in the LDL receptor gene". Atherosclerosis. Agosto 2002. Vol 163, n°2, páginas 399-407.	1-16
X	WO 0206467 A1 (BML, Inc.) 24.01.2002	1-16
A	VARRET M. et al. "Results of the molecular analysis of the 220 point mutations in the human LDL receptor gene database". Atherosclerosis. Octubre 1997. Vol 134, n° 1-2, páginas 74-74.	1-16

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T"

documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X"

documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y"

documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&"

documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

12 Mayo 2004 (12.05.2004)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

11 JUN 2004 11.06.2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

J. Manso Tomico

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

N° de teléfono + 34 91 349

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2004/070001

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	US 4966837 A (UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 30.10.1990.	1-16

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2004/070001

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 0206467 A	24.01.2002	AU 7106001 A	30.01.2002
		CA 2416533 A	15.01.2003
		EP 1304374 A	23.04.2003
		EP 20010950004	17.07.2001
US 4966837 A	30.10.1990	WO 8604090 A	17.07.1986
		AU 5306586 A	29.07.1986
		SE 8603591 A	26.08.1986
		FI 863474 A	27.08.1986
		NO 863438 A	27.08.1986
		DK 409286 A	28.08.1986
		NL 8520436 T	03.11.1986
		EP 0205574 A	30.12.1986
		EP 19860900490	16.12.1985
		GB 2178743 AB	18.02.1987
		BR 8507148 A	31.03.1987
		HU 41838 A	28.05.1987
		JP 62501327 T	04.06.1987
		DE 3590702 T	16.07.1987
		US 4745060 A	17.05.1988
		CH 671776 A	29.09.1989
			29.09.1989
			29.09.1989